



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE FARMÁCIA

MATHEUS MARLEY BEZERRA PESSOA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA E ANTIMICROBIANA DO *p*-
CIMENO EM MODELOS EXPERIMENTAIS.**

JOÃO PESSOA –PB
JUNHO - 2018

MATHEUS MARLEY BEZERRA PESSOA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA E ANTIMICROBIANA DO *p*-
CIMENO EM MODELOS EXPERIMENTAIS.**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Farmácia,
do Centro de Ciências da Saúde,
da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Bacharel
em Farmácia.**

Orientadora: Profa. Dra. Leônia Maria Batista

**JOÃO PESSOA –PB
JUNHO –2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P475a Pessoa, Matheus Marley Bezerra.

Avaliação da atividade antidiarreica e antimicrobiana
do p-cimeno em modelos experimentais / Matheus Marley
Bezerra Pessoa. - João Pessoa, 2018.
94 f. : il.

Orientação: Leônia Maria Batista.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCS.

1. p-cimeno. 2. antidiarreica. 3. antimotilidade. 4.
antisecretória. 5. antimicrobiana. I. Batista, Leônia
Maria. II. Título.

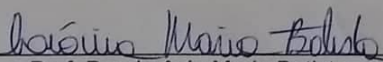
UFPB/BC

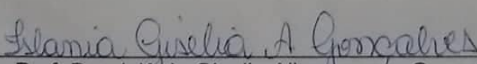
MATHEUS MARLEY BEZERRA PESSOA

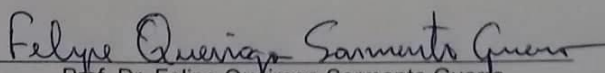
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA E ANTIMICROBIANA DO *p*-
CIMENO EM MODELOS EXPERIMENTAIS.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Farmácia,
do Centro de Ciências da Saúde,
da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos
requisitos para obtenção do grau
de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 08 de JUNHO de 2018.


Prof. Dra. Leônia Maria Batista
Universidade Federal da Paraíba- UFPB


Prof. Dra. Islânia Gisélia Albuquerque Gonçalves
Universidade Federal da Paraíba- UFPB


Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra
Universidade Federal da Paraíba- UFPB

AGRADECIMENTOS

À Deus, esse ser maior, que me concedido o dom da vida, força e determinação. Por me Iluminar em cada passo, me fazendo seguir correndo atrás dos meus sonhos.

Ao orixá que me gerou, e os epíritos de luz que servem como guia me fortalecendo de energia positiva e força para seguir em frente.

À minha família, pelo amor e apoio incondicional que contribuíram para formação do meu caráter. Em especial a minha mãe Elvira Bezerra, além de todas as atribuições do que ser mãe significa, agradeço por ser a maior incentivadora e promotora dos meus estudos. E ao meu pai Paulo Pessoa, por todo amor, dedicação, incentivo e por sempre me apoiar em todas as minhas escolhas.

À Profa. Dra. Leônia Maria Batista, pela confiança e ensinamentos ao longo dessa jornada. Obrigado por proporcionar essa conquista.

À Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira e Hermes Diniz Neto pelas colaborações junto ao presente estudo.

À Profa. Dra. Islânia Giselia Albuquerque Gonçalves e ao Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, pela participação na banca examinadora.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal, Edvaldo Alves, Flávia Danniele Frota Machado, Michelle Liz, Catarina Alves, Rodrigo de Oliveira Formiga e Igor Rafael Praxedes de Sales por toda ajuda na realização dos experimentos e também pelos momentos de descontração, e em especial a, por me ajudar em todas as etapas desse trabalho e pela amizade fora do laboratório.

Aos professores que fizeram parte da minha graduação em farmácia, pelos conhecimentos adquiridos durante as disciplinas, contribuindo na minha formação profissional.

Aos meus amigos/irmãos, Heretiano Neto e Iago Guimarães, por ter acreditado e apoiado minha caminhada. Obrigado por todos os momentos que vivemos.

A Rick William de Camargo, pelo apoio diário, parceria e contribuição no presente estudo e na minha vida acadêmica. Acima de tudo, por ser um incentivador constante do meu sucesso e crescimento como profissional e ser humano. Muito Obrigado por todo amor e dedicação.

Aos meus queridos amigos, Ana Rita, Ana Karolanne, Antônio Raphael, Paulo Roberto, Lucas, Eduardo, Nicolás, Indyra Figueiredo, Renato Galdino e Tássio Macedo. Muito obrigado por todo carinho e por caminhar comigo durante essa fase, compartilhando as alegrias e angústias.

Em especial a Monique Emanuella Frutuoso Xavier Barros, por todo o apoio e carinho e pela parceria desde sempre.

A José Crispim Duarte e Roberta Parentoni responsáveis pelo biotério, por todo auxílio técnico fornecido, apoio nos momentos difíceis e de descontração.

Ao funcionário da empresa ALERTA, Josué, pelo carinho e apoio.

A cada um dos animais de laboratório que contribuíram com suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

A Universidade Federal da Paraíba, pelo suporte estrutural e financeiro

Muito Obrigado!

Matheus Marley.

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância...”

Simone de Beauvoir

RESUMO

O *p*-cimeno (*p*-isopropiltolueno) é um composto orgânico aromático da classe dos monoterpenos sendo considerado o precursor do carvacrol. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antidiarreica do *p*-cimeno, os efeitos sobre a motilidade gastrointestinal e possíveis mecanismos de ação relacionados, além da atividade antimicrobiana em modelos experimentais. No modelo de diarreia induzida por óleo de rícino, o *p*-cimeno nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg apresentou atividade antidiarreica, com percentual de inibição 85% ($p < 0,01$) e 100% ($p < 0,001$), respectivamente, quando comparados ao controle negativo. No modelo de esvaziamento gástrico, o *p*-cimeno (50, 100 e 200 mg/kg) reduziu o esvaziamento gástrico para 89% ($p < 0,01$), 84% ($p < 0,001$) e 79% ($p < 0,001$), respectivamente, quando comparados ao grupo de controle negativo. No modelo de trânsito intestinal, todas as doses avaliadas (25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg) reduziram a motilidade intestinal comparadas ao controle negativo, com percentuais de inibição de 49% ($p < 0,001$), 47% ($p < 0,001$), 42% ($p < 0,001$) e 29% ($p < 0,001$), respectivamente. Nos mecanismos de ação antimotoilidade, o *p*-cimeno reverteu o percentual de trânsito intestinal quando bloqueado com L-NAME, glibenclamida, propranol e ioimbina, para 85% ($p < 0,001$), 89% ($p < 0,001$), 84% ($p < 0,001$) e 92% ($p < 0,001$), respectivamente. Para os resultados de enteropooling, o *p*-cimeno reduziu o peso do fluido intestinal para 42% ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle negativo. Na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do *p*-cimeno (1024 $\mu\text{g/mL}$ – 16 $\mu\text{g/mL}$) foi observado no modelo da concentração inibitória mínima (CIM) que o *p*-cimeno apresentou inibição do crescimento até 32 $\mu\text{g/mL}$ e na concentração fungicida mínima (CFM) e bactericida mínima (CBM) essa inibição foi até 64 $\mu\text{g/mL}$. Dessa forma, o *p*-cimeno possui atividade antidiarreica, e esta atividade está relacionada ao efeito antimotoilidade e antissecretória. O efeito antimotoilidade está relacionado com a participação das vias nitrérgica, adrenérgicas e KATP desse terpeno. Além disso, o *p*-cimeno possui atividade antimicrobiana relacionada ao efeito antifúngico e antibacteriano desse composto.

PALAVRAS CHAVE: *p*-cimeno, antidiarreica, antimotoilidade antissecretório, e antimicrobiana.

ABSTRACT

p-Cymene (*p*-isopropyltoluene) is an aromatic organic compound of the monoterpene class and is considered the precursor of carvacrol. The objective of the present study was to evaluate the antidiarrheal activity of *p*-cymene, effects on gastrointestinal motility and possible related mechanisms of action, as well as antimicrobial activity in experimental models. In the castor oil-induced diarrhea model, *p*-cymene at doses of 100 mg / kg and 200 mg / kg showed antidiarrheal activity, with 85% inhibition ($p < 0.01$) and 100% ($p < 0.001$), respectively, when compared to the negative control. In the gastric emptying model, *p*-cymene (50, 100 and 200 mg / kg) reduced gastric emptying by 89% ($p < 0.01$), 84% ($p < 0.001$) and 79% ($p < 0.001$), respectively, when compared to the negative control group. In the intestinal transit model, all doses evaluated (25 mg / kg, 50 mg / kg, 100 mg / kg and 200 mg / kg) reduced intestinal motility compared to the negative control, with percentages of inhibition 49% ($p < 0.001$), 47% ($p < 0.001$), 42% ($p < 0.001$) and 29% ($p < 0.001$), respectively. In the antimotility mechanisms, *p*-cymene reversed the percentage of intestinal transit when blocked with L-NAME, glibenclamide, propranolol and yohimbine, in 85% ($p < 0.001$), 89% ($p < 0.001$), 84% ($p < 0.001$) e 92% ($p < 0.001$), respectively. For enteropooling results, *p*-cymene reduced intestinal fluid weight by 42% ($p < 0.001$) when compared to the negative control group. In the evaluation of the antibacterial and antifungal activity of *p*-cymene (1024 $\mu\text{g/mL}$ - 16 $\mu\text{g/mL}$), it was observed in the minimum inhibitory concentration (MIC) model that *p*-cymene showed growth inhibition up to 32 $\mu\text{g/mL}$ and concentration minimum fungicide (CFM) and minimum bactericidal (CBM) inhibition was up to 64 $\mu\text{g/mL}$. Thus, *p*-cymene has antidiarrheal activity, and this activity is related to the antimotility and antisecretory effect. The antimotility effect is related to the participation of the nitrergic, adrenergic and KATP pathways of this terpene. In addition, *p*-cymene has antimicrobial activity related to the antifungal and antibacterial effect of this compound.

KEY WORDS: *p*-cymene, antidiarrheal, antimotility, antisecretory and antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de contração do músculo liso.....	23
Figura 2: Mecanismos de ação da secreção intestinal.....	25
Figura 3: Resumo do conteúdo microbiano encontrado no TGI.....	28
Figura 4: Efeitos mediados por SCFAs de bactérias comensais no intestino...	30
Figura 5: Visão Geral da Biossíntese de Terpenos pela via do Mevalonato....	42
Figura 6: Estrutura química do <i>p</i> -cimeno.....	43
Figura 7: Reação de isopropilação do tolueno.....	44
Figura 8: Mecanismo de ação antiinflamatória e antioxidante do <i>p</i> -cimeno.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito da administração oral do *p*-cimeno e da loperamida na diarreia induzida por óleo de rícino.....51

Tabela 2: Avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM ($\mu\text{g/mL}$) do *p*-cimeno em cepas bacterianas e fúngicas.....63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Mecanismos de contração do músculo liso.....	56
Gráfico 2: Mecanismos de ação da secreção intestinal.....	57
Gráfico 3: Resumo do conteúdo microbiano encontrado no TGI.....	58
Gráfico 4: Efeitos mediados por SCFAs de bactérias comensais no intestino.	59
Gráfico 5: Visão Geral da Biossíntese de Terpenos pela via do Mevalonato...	60
Gráfico 6: Estrutura química do <i>p</i> -cimeno.....	61
Gráfico 7: Reação de isopropilação do tolueno.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC ciclase de adenilil

ACh acetilcolina

AINÉ antiinflamatório não-esteroidal

AMPc 3',5'- monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA análise de variância de uma via

CAT Catalase

CBiotec centro de biotecnologia

CCK Colecistocinina

CCK-1 receptor de colecistocinina 1

CCK-2 receptor de colecistocinina 2

CCS Centro de Ciências da Saúde

CFTR regulador de condutância transmembrana da fibrose cística

cGKII cGMP dependente de quinase II

CGRP peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX Ciclooxygenase

d.p. desvio padrão

DNA ácido desoxirribonucleico

ECL células semelhantes às enterocromafins

eNOS sintase de óxido nítrico endotelial

EP receptor de prostaglandina E

ER retículo endoplasmático

FGF fator de crescimento de fibroblastos

GCs ciclase de guanilil solúvel

GMPc monofosfato cíclico de guanosina

GPx glutational peroxidase

Gq/11 proteína Gq ou proteína 11

GR glutational redutase

GSH glutational reduzida

GSSH glutational oxidada

Gα12/13 Proteína Gα 12/13

H₂O₂ peróxido de hidrogênio

HSP proteína de choque térmico

i.p. Intraperitoneal

IL-1β interleucina 1 beta

IL-8 interleucina 8

iNOS sintase de óxido nítrico induzível

IP₃ 1,4,5-trisfosfato de inositol

IP₃ trisfosfato de inositol

L-NAME N-nitro-L-arginina metil éster

M3 receptor muscarínico 3

MDA Malondialdeído

MLC cadeia leve de miosina

MLCP fosfatase da cadeia leve de miosina

MPO Mieloperoxidase

nNOS sintase de óxido nítrico neuronal

NO óxido nítrico

NOS sintase de óxido nítrico

O₂ oxigênio molecular

O²⁻ ânion superóxido

OH· radical hidroxila

PDGF fator de crescimento derivado de plaquetas

PG Prostaglandina

PGE₂ prostaglandina da série E

PGI₂ prostaciclina

PK proteína quinase

PKA proteína quinase dependente de AMPc

PKC proteína quinase C

PKG proteína quinase dependente de GMPc

PLC fosfolipase C

PLC β fosfolipase C β

RhoA proteína GTPase da família Rho

RhoK Rho quinase

RNS espécies reativas de nitrogênio

ROS espécies reativas de oxigênio

SNA sistema nervoso autônomo

SNC sistema nervoso central

SNE sistema nervoso entérico

SOD superóxido dismutase

TNF α fator de necrose tumoral α

UFPB Universidade Federal da Paraíba

v.o. via oral

VEGF fator de crescimento endotelial vascular

VIP peptídio intestinal vasoativo

Obs: As abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Considerações gerais.....	17
1.2 Fundamentação teórica.....	19
1.2.1 Fisiologia do Trato gastrointestinal (TGI).....	19
1.2.1.1 Microbiota gastrointestinal humana.....	26
1.2.2 Diarreia.....	33
1.2.3 Produtos naturais.....	38
1.2.3.1 Óleos essenciais.....	40
1.2.3.2 Terpenos.....	41
1.2.3.3. Constituinte ativo selecionado para estudo: <i>p</i> -cimeno.....	43
2. OBJETIVOS.....	46
2.1 Geral.....	46
2.2 Específicos.....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Materiais.....	47
3.1.1 Material de estudo (<i>p</i> -cimeno).....	47
3.1.2 Animais.....	47
3.1.3 Meios de cultura.....	47
3.1.4. Microorganismos.....	48
3.1.4.1 Inóculo.....	48
3.1.5. Locais da Pesquisa.....	49
3.2. Metodologias experimentais.....	49
3.2.1. Avaliação da atividade antidiarreica e de efeitos na motilidade gastrointestinal.....	49
3.2.1.1. Diarreia induzida por óleo de rícino.....	49
3.2.1.2. Avaliação de efeitos no esvaziamento gástrico.....	49

3.2.1.3. Avaliação de efeitos no trânsito intestinal.....	50
3.2.2 Mecanismos de ação antimotilidade.....	51
3.2.2.1 Avaliação da participação dos receptores adrenérgicos, NO e dos KATP nos mecanismos anti-motilidade do <i>p</i> -cimeno no modelo de trânsito intestinal.....	51
3.2.3. Avaliação do mecanismo antissecretório do <i>p</i> -cimeno no modelo de acumulação intraluminal de fluido (enteropooling) induzido por óleo de rícino.....	52
3.2.4. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do <i>p</i> -cimeno....	52
3.2.4.1 Concentração inibitória mínima (CIM).....	52
3.3 Análise estatística.....	54
4. RESULTADOS.....	55
4.1. Efeito do <i>p</i> -cimeno sobre a diarreia em camundongos induzida pelo óleo de rícino.....	55
4.2 Efeito do <i>p</i> -cimeno sobre o esvaziamento gástrico.....	55
4.3 Efeito do <i>p</i> -cimeno no trânsito intestinal.....	56
4.4. Avaliação da participação do NO no mecanismo anti-motilidade do <i>p</i> -cimeno no modelo de trânsito intestinal.....	57
4.5. Avaliação da participação do KATP no mecanismo anti-motilidade do <i>p</i> -cimeno no modelo de trânsito intestinal.....	58
4.6. Avaliação da participação dos receptores adrenérgicos pós sinápticos no mecanismo anti-motilidade do <i>p</i> -cimeno no modelo de trânsito intestinal.....	59
4.7. Avaliação da participação receptores pré-sinápticos α_2 adrenérgicos no mecanismo anti-motilidade do <i>p</i> -cimeno no modelo de trânsito intestinal.....	60
4.8. Avaliação da acumulação intraluminal de fluido (enteropooling) induzido por óleo de rícino em camundongos.....	61
4.9 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do <i>p</i> -cimeno no modelo da concentração inibitória mínima (CIM).....	62
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Desde a antiguidade, a diarreia foi reconhecida como uma das afecções do trato gastrointestinal mais endêmicas no mundo, acometendo pessoas de todas as idades que resultam em perda eletrolítica, desidratação, choque e, e pode levar, morte (HIMANSHU et al., 2016; FERNANDO et al., 2010).

A diarreia é uma desordem gastrointestinal que resulta de um desequilíbrio entre mecanismos absorptivos e secretórios no trato gastrointestinal ocasionando um excesso de fluido nas fezes, afetando milhões de pessoas em todo mundo, o que representa um alto custo não só para o indivíduo como também para o sistema de saúde (NIETO, 2012; WHO, 2013; XU et al., 2013; THAVORN; DUTRA et al., 2016).

A doença diarreica é um problema de saúde mundial associado a altas taxas de morbidade e mortalidade principalmente em países em desenvolvimento (SILVAET al., 2016). A diarreia é uma doença que sempre ameaça a saúde dos seres humanos, especialmente crianças menores de cinco anos (WARDLAW et al., 2010; SHEN et al., 2014).

Em países em desenvolvimento as preparações medicinais a partir de plantas são quase sempre a única fonte terapêutica facilmente acessível para o controle de doenças, a exemplo da diarreia (GREEN et al., 2010; NJUME; GODUKA, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial faz uso da medicina tradicional para cuidados primários de saúde (OMWENGA et al., 2015). Muitas espécies vegetais e seus produtos isolados representam uma grande fonte de novos agentes terapêuticos para os distúrbios diarreicos (BANSAL et al., 2009; AWAAD; EL-MELIGY, 2013).

Nessa perspectiva a busca por novas alternativas terapêuticas, a exemplo dos produtos naturais, em especial as plantas medicinais para o tratamento da diarreia, que sejam menos tóxicas e mais eficazes, se faz necessária, diante das

limitações que a terapêutica atual apresenta, como constipação, náuseas e câncer de cólon retal (HIMANSHU et al., 2016; FERNANDO et al., 2010).

Vários tipos de compostos naturais bioativos derivados de plantas medicinais são utilizados como matéria-prima para descoberta de novas drogas (RAMAWAT et al., 2009). Como alcalóides, saponinas, carboidratos, glicosídeos, flavonóides, gomas, esteróides, taninos, compostos fenólicos, óleos essenciais e terpenos. (AKINMOLADUN et al., 2007; DUTRA et al., 2016).

Assim, os produtos naturais de origem vegetal, em especial os terpenos, apresentam um importante papel no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (ZANGH et al., 2013), utilizadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais como a diarreia (SILVA et al., 2009).

Estudos experimentais em modelos animais têm sido conduzidos na perspectiva de avaliar a atividade antidiarreica de espécies medicinais, (extratos, frações, substâncias isoladas) e compostos biossintéticos, assim como, elucidar os mecanismos a ela relacionados (mecanismo anti-motilidade e antissecretórios) (UMAR et al., 2015).

Dentre os compostos bioativos, tem-se o *p*-cimeno, um monoterpeno que ocorre naturalmente em mais de 100 plantas (BENCHAAAR et al., 2008), mas também pode ser de origem sintética a partir da isopropilação do tolueno (PARIKH et al., 1992; SELVARAJ et al., 2002).

É nesse contexto, que se considera de grande importância à investigação do *p*-cimeno em relação à atividade antidiarreica e antimicrobiana, uma vez que o *p*-cimeno apresentou resultados promissores frente a atividade gastroprotetora (LEITE, 2014), antiulcerogênica e antiinflamatória (FORMIGA, 2017) em modelos experimentais. Como também, em pesquisas realizadas na base de dados, não foram encontrados relatos de estudos farmacológicos a respeito das atividades a serem avaliadas no presente estudo com esse monoterpeno.

1.2. Fundamentação teórica

1.2.1 Fisiologia do Trato gastrointestinal (TGI)

O TGI consiste em um tubo muscular que se estende da boca ao ânus) e tem como funções digestão, absorção, secreção e motilidade (CAMPBEL, 2014; CHENG et al., 2010).

A motilidade do TGI consiste em vários fenômenos mensuráveis, incluindo a atividade contrátil entérica, as funções biomecânicas da parede intestinal e o fluxo intraluminal responsável pela propulsão do conteúdo intestinal. A sensibilidade do TGI, que se refere tanto à percepção consciente dos estímulos intestinais como à entrada aferente dentro das vias sensoriais gastrintestinais, está intrinsicamente ligada. Desta forma, a motilidade intestinal pode ser a consequência de funções motoras sensoriais inter-relacionadas (DIMIDIET al., 2017).

Estes fenômenos são regulados pela coordenação da contração e relaxamento das células do músculo liso na camada muscular. Outros fatores como as secreções intestinais, sistema imunológico e a microbiota gastrintestinal e seus produtos de fermentação também interagem e modulam a motilidade intestinal. Alterações nesses processos podem ocasionar sintomas digestivos, como constipação e diarreia (JUNYA et al., 2017; LACYET al., 2015).

O processo da motilidade inclui movimentos peristálticos do esôfago, processos de contração, segmentação, trânsito intestinal e esvaziamento gástrico (SANDERS, 2012; CAMPBEL, 2014).

O esvaziamento gástrico compreende um conjunto de alterações na motilidade gástrica, que leva a propulsão do quimo para a porção inicial do intestino, o duodeno. Essa passagem se dá pelo aumento da pressão intraluminal na parte proximal do estômago e ao aumento da força da contração antral, que será regulada pelas vias neurais e hormonais, alterando assim a velocidade desse esvaziamento gástrico (DENNIS et al., 2016; EFEYANT al., 2015).

A colecistocinina (CCK) é um dos principais reguladores nesse processo inibindo o esvaziamento gástrico em resposta a gordura presente no duodeno, promovendo a contração da vesícula biliar, o relaxamento do esfíncter de Oddi e a secreção pancreática, necessários para digestão intestinal (SHARKEY; MAWE, 2014). Além disso, outras características podem determinar o esvaziamento gástrico, como ansiedade, depressão e exercício físico.

Distúrbios nesses processos têm sido associados a uma variedade de desordens gastrointestinais, como a dispepsia funcional, doença do refluxo gastroesofágico, úlcera duodenal, síndrome do intestino irritável, prisão de ventre e diarreia (CAMILLERI, 2016; NITZAN et al., 2016).

O trânsito intestinal é a consequência funcional das contrações intestinais, tônicas e fásicas e refere-se ao tempo de injeção do conteúdo intraluminal para percorrer o trato gastrointestinal (KELLOW et al., 2006). Apesar de uma ampla variação entre os indivíduos, o tempo normal de trânsito intestinal inteiro é considerado de 30 a 40 horas (KIM et al., 2012; KOTLOFF et al., 2013)

O TGI difere de todos os outros órgãos periféricos, pois possui um vasto sistema nervoso intrínseco, denominado sistema nervoso entérico (SNE) que pode controlar as funções do intestino, mesmo quando está completamente separado do sistema nervoso central (SNC) (FURNESS et al., 2017).

O SNE tem múltiplos papéis: determinar os padrões de movimento do trato gastrointestinal; controlar a secreção de ácido gástrico; regular o movimento do fluido através do epitélio do revestimento; mudar o fluxo sanguíneo local; modificar o manuseio de nutrientes; e interagindo com os sistemas imune e endócrino do intestino (FURNESS, 2012; 2017).

A atividade motora do TGI é um processo complexo que envolve vários tipos de células, como os neurônios entéricos que podem detectar o conteúdo do TGI, integrar informações e conceber um padrão motor adequado, as células intersticiais de Cajal (ICC) que traduzem as entradas dos neurônios motores entéricos e geram ritmicidade elétrica intrínseca e células musculares lisas que podem interpretar e integrar grandes matrizes de insumos e desenvolver respostas adequadas (FURNESS, 2012).

As ICCs estão localizadas entre as terminações nervosas e células musculares lisas no TGI e podem ser consideradas uma população especializada de células musculares lisas. Ambas surgem de células mesenquimais comuns. No entanto, enquanto as células musculares lisas desenvolvem uma gama de elementos contráteis, as ICCs tem poucos elementos contráteis, mas contém grande número de mitocôndrias, retículo endoplasmático abundante e conjuntos distintos de canais em sua membrana (BECK et al. 2018).

Os movimentos peristálticos que caracteriza-se como ondas de contração que se propagam ao longo do TGI para várias distâncias como meio de misturar e propelir seu conteúdo distalmente, é um exemplo de um padrão motor orquestrado por sequenciação complexa de excitação e inibição neural em cooperação com mecanismos de controle muscular intrínseco, mediado pelas ICCs (BAKER; BECK et al. 2018).

Vários fatores regulam a motilidade intestinal, como a passagem do bolo alimentar por todo o trato gastrointestinal, favorecendo os processos de propulsão e segmentação do tecido por meio de vias neurais aferente e eferente que é fornecido pela interação do intestino com o SNC e SNE (BROWNING et al., 2014).

Essa interação possibilita a liberação de mediadores clássicos, colinérgicos e adrenérgicos, além de outros neurotransmissores como os mediadores não-adrenérgicos e não-colinérgicos (NANC), os sistemas nitrérgico (NO), dopaminérgico e opióide (BECK et al., 2018; DANTAS, 2008; MANABE et al., 2010; NAM, et al, 2016).

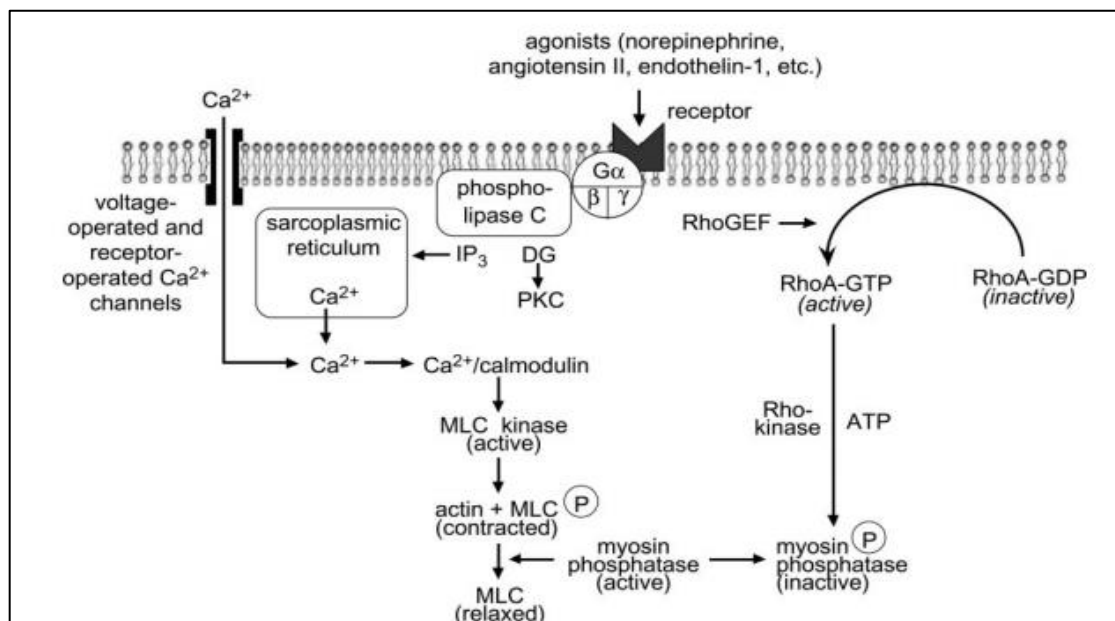
A regulação da contração do músculo liso é mediada por diversos neurotransmissores e hormônios que se ligam a receptores específicos para ativar a contração muscular lisa. Essa ligação vai aumentar a atividade da fosfolipase C que está acoplada a proteína G, como por exemplo a ligação de acetilcolina nos receptores muscarínicos M_3 presente na célula muscular lisa. Uma vez ativada a fosfolipase C produz dois segundos mensageiros do fosfatidilinositol lipídico de membrana 4,5-bisfosfato: diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3). O IP_3 liga-se a receptores específicos no retículo

sarcoplasmático, causando a liberação de cálcio ativador (Ca^{2+}). O DAG juntamente com Ca^{2+} vai ativar Proteína quinase C a PKC, que fosforila proteínas alvo específicos cujo efeitos promovem a contração, como fosforilação dos canais de cálcio ou outras proteínas que regulam a liberação de cálcio intracelular. O cálcio liga-se à calmodulina, levando à ativação da quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) esta quinase fosforila a cadeia leve da miosina e, em conjunto com a actina, promove o encurtamento da célula do músculo liso, e contração (Fig. 1) (BERRIDGE et al., 2014; WEBB et al., 2017).

No entanto, a elevação da concentração de cálcio intracelular é transitória e a resposta contrátil é mantida por um mecanismo de sensibilização de Ca^{2+} resultante da inibição da atividade da miosina fosfatase pela Rho quinase. Este mecanismo de sensibilização de Ca^{2+} é iniciado ao mesmo tempo que a fosfolipase C é ativada e envolve a ativação da proteína de ligação a GTP, a RhoA. A ativação de RhoA pelo receptor acoplado à proteína G não é inteiramente clara, mas envolve um fator de troca de nucleótidos de guanina (RhoGEF) e migração de RhoA para a membrana plasmática. Após a ativação, RhoA aumenta a atividade da Rho quinase, levando a inibição da fosfatase de miosina. Isso promove o estado contrátil, uma vez que a cadeia leve da miosina não pode ser desfosforilada (BERRIDGE et al., 2014; WEBB et al., 2017). (Fig. 1)

O relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil. Independentemente disso, o processo de relaxamento requer uma diminuição do cálcio intracelular e um aumento da atividade da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP). O retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática contêm Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPases que removem Ca^{2+} do citosol. Os trocadores $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ também estão localizados na membrana plasmática e ajudam a diminuir o Ca^{2+} intracelular. Durante o relaxamento, os canais de cálcio sensíveis a voltagem localizados na membrana plasmática se fecham, diminuindo o influxo de Ca^{2+} , o que leva a uma consequente diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular (BERRIDGE et al., 2014; WEBB et al., 2017).

Figura 1: Mecanismos de contração do músculo liso (Fonte: WEBB et al., 2017).



Ca²⁺ íons cálcio, IP3 trisfosfato de inositol, MLC- cadeia leve de miosina, MLCP-fosfatase da cadeia leve de miosina, PLCβ - fosfolipase C β, Gq11-Proteína Gq ou proteína 11; Gα12/13-Proteína Gα 12/13, RhoA-proteína GTPase da família Rho, RhoK- Rho quinase; Rho-GEF fator de permuta do GDP a GTP, PKC- proteína quinase C, GCα e GCβ- ciclase de guanilil solúvel α e β, GMPC- monofosfato cíclico de guanosina, AMPc-monofosfato cíclico de adenosina, PKG- proteína quinase G, PKA- proteína quinase A.

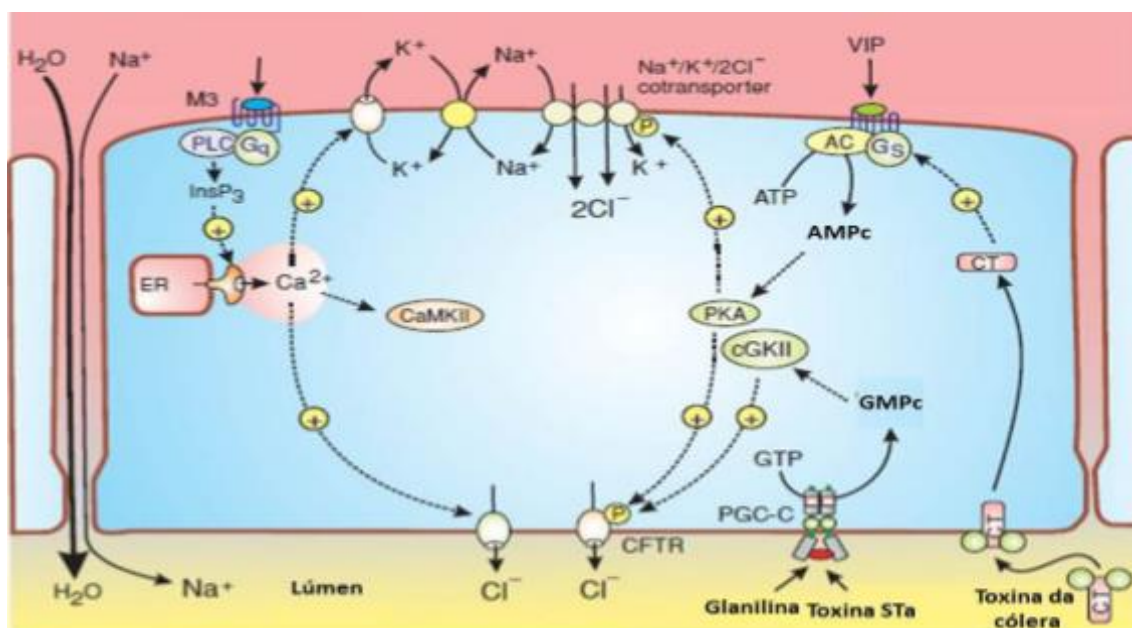
Outros mediadores químicos também estão relacionados com o relaxamento do músculo liso como o óxido nítrico (NO) que por ativação da guanilil ciclase solúvel (GC), resulta na ativação de canais para K⁺ na membrana plasmática gerando hiperpolarização e consequentemente relaxamento muscular (KHROMOVET al., 2006; SANDERS et al., 2012).

A secreção intestinal de líquido e eletrólitos é fundamental para digestão, absorção e formação das fezes. O processo é regulado por atividades coordenadas de canais iônicos nos enterócitos. O sentido e a velocidade do movimento do fluido no intestino são decididos por atividades de canais de cloreto na membrana apical. A secreção intestinal dependente de cloreto é regulada por via nucleica de cíclica e/ou via de sinalização de Ca²⁺ (BO et al., 2015). O regulador de condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR), clonado e caracterizado por Riordan e colaboradores em 1989, está localizado

predominantemente nas células da cripta intestinal e tem sido associado à secreção de íons Cl^- AMPc-dependente (BO et al., 2015).

A secreção intestinal é controlada por uma variedade de fatores, incluindo acetilcolina (ACh) e peptídeo intestinal vasoativo (VIP). A ACh atua pela via de sinalização 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3)/ Ca^{2+} e o aumento do cálcio ativa canais para K^+ e para Cl^- , responsáveis pela secreção de fluido. Por outro lado, o VIP age pela via AMPc/PKA, pois essa quinase fosforilada controla o transporte de Cl^- no regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR). O fluxo de Cl^- para o lúmen, em seguida, proporciona a atração de íons Na^+ , fornecendo o gradiente osmótico para o fluxo de água (BERRIDGE, 2014) (Fig. 2)

Figura 2: Mecanismos de ação da secreção intestinal (Fonte: BERRIDGE et al., 2014).



Na^+ íon sódio, M3-receptor muscarínico 3, ER-retículo endoplasmático, Ca^{2+} íon cálcio, K^+ íon potássio, PLC - fosfolipase C, AC-ciclase de adenilil, Gq-Proteína Gq ou proteína 11, CaMKII-proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina, Cl^- íon cloreto, ATP-trifosfato de adenosina, Gs-Proteína G estimulatória, PKA- proteína quinase A, VIP- peptídeo intestinal vasoativo, cGKII-cGMP dependente de quinase II, GMPc- monofosfato cíclico de guanosina, AMPc-monofosfato cíclico de adenosina, CFTR- regulador de condutância transmembrana da fibrose cística, CT-toxina colérica, GTP- trifosfato de guanosina, toxina STa- enterotoxina termoestável da *Escherichia coli*, PGC-C- proteína ciclase de guanilil C.

Outros mediadores como substância P, gastrina e serotonina, e os inibidores, como a noradrenalina, peptídio YY, prostaglandinas, dopamina, além dos já citados CCK e NO, também estão envolvidos nos processos secretórios e da motilidade intestinal, atuando localmente ou de forma reflexa por meio de vias extrínsecas ou intrínsecas (KOEPPEN; STANTON, 2009; CHEN et al., 2010).

Perturbações nas funções do TGI que alterem processos fisiológicos como a secreção e motilidade intestinal podem levar a distúrbios como a disfagia, dispepsia, doenças inflamatórias intestinais, síndrome do intestino irritável e diarreia, seja devido a uma aceleração no trânsito intestinal ou por contrações de alta amplitude (SPILLER, 2006; WHYTE; JENKINS, 2012).

1.2.1.1 Microbiota gastrintestinal humana

A microbiota gastrintestinal humana ("microflora") consiste em um grupo de microorganismos que vivem no TGI. Eles compreendem um ecossistema metabolicamente ativo e complexo, composto por centenas de milhares de microorganismos (bactérias, vírus e fungos) que colonizam o TGI logo após o nascimento (MARTIN et al., 2014; DAVE et al., 2012). Estima-se que o sistema intestinal humano contém mais de 500 espécies microbianas e aproximadamente 10^{14} células bacterianas funcionais e também inclui fungos, leveduras, vírus e protozoários (STEVENSON et al., 2012).

Nos seres humanos, a densidade microbiana aumenta da extremidade proximal para a extremidade distal do intestino e compreende uma biomassa de 1,5 a 2,0 kg, dominada por bactérias estritamente anaeróbias (QIN et al., 2010). Archaea, Eukarya e vírus também estão presentes, mas sua relevância para a saúde humana tem sido menos estudada. Embora a grande maioria da comunidade microbiana intestinal seja composta por apenas cinco filos (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia), existe considerável diversidade no nível de espécies bacterianas e suas abundâncias relativas (QIN et al., 2010).

Os principais membros da *Firmicutes* incluem os gêneros *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus*, bem como os produtores de butirato

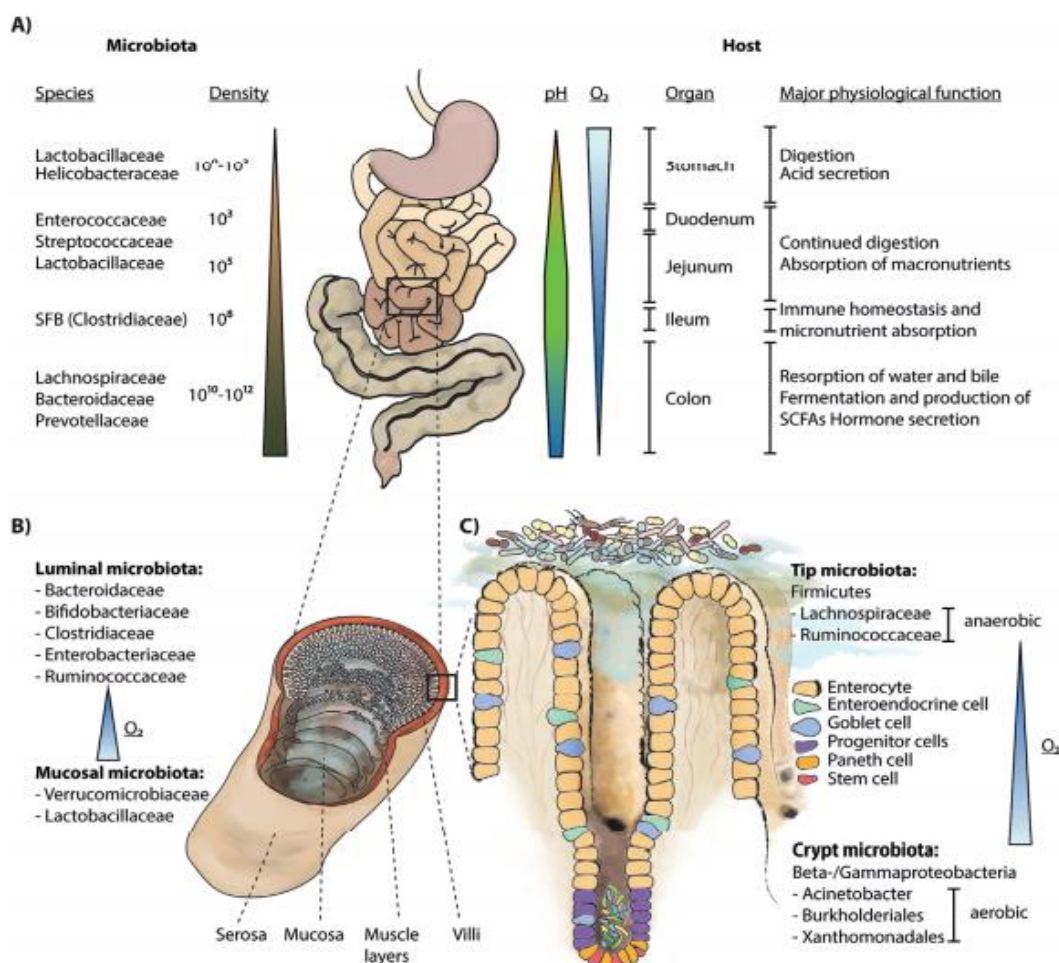
Eubacterium, *Fecalibacterium* e *Roseburia*. Os membros de Bacteroidetes são conhecidos por serem eficientes degradadores de fibra alimentar e incluem os gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Xylanibacter*. *Bifidobacterium* é um gênero principal dentro Actinobacteria, e diversos táxons são usados como probióticos. Proteobacteria inclui *Escherichia* e *Desulfovibrio*, enquanto a Verrucomicrobia até agora inclui apenas o gênero degradador de muco *Akkermansia* (SCHROEDER et al.; SOMMER e BACKHED, 2016). Uma representação completa do conteúdo microbiano no TGI humano pode ser encontrada na Figura 3.

Assim, existem várias interações hospedeiro-microbiota que podem levar a manutenção de processos fisiológicos e homeostase. Todo o tecido que reveste o TGI pode ser dividido em compartimentos com gradientes celulares, funcionais e microbianos, os quais são influenciados mutuamente nas interações homeostáticas e podem levar a diferentes resultados de sinalização nos processos fisiológicos (SCHROEDER et al.; SOMMER e BACKHED, 2016).

Os diferentes compartimentos ao longo do TGI suportam diferentes microbiotas específicas que dependem das funções fisiológicas, estrutura do tecido, pH, concentração de oxigênio e distribuição de células epiteliais. Da mesma forma, a densidade e complexidade da microbiota aumentam à medida que se aproxima da porção distal, com a composição variando ao longo de todo o comprimento intestinal. Essa microbiota específica do local, portanto, induz respostas locais do hospedeiro e, assim, programa funções fisiológicas gerais e homeostáticas (Fig. 3) (SOMMER e BACKHED, 2016).

A microbiota estabelece uma associação dinâmica de benefícios mútuos (simbiose) com o organismo humano, o que resulta na manutenção de funções imunológicas, metabólicas e motoras normais, bem como a correção da digestão e absorção de nutrientes (GOULET et al., 2015; GUARNER et al., 2013; PASSOS et al., 2017).

Figura 3: Resumo do conteúdo microbiano encontrado no TGI (Fonte: SOMMER, BACKHED, 2016).



A: Os parâmetros fisiológicos que variam em conformidade aos segmentos intestinais, por exemplo, estrutura do tecido, pH, concentração de oxigênio e distribuição de células epiteliais. **B:** Dentro de um segmento intestinal, a composição da microbiota difere entre lúmen e mucosa. **C:** mesmo ao longo do eixo cripta-vilosidade no epitélio.

Nas funções digestivas do organismo junto a microbiota tem-se a fermentação de carboidratos complexos em ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) por parte das bactérias dessa população (KRISHNAN et al., 2015). Os SCFAs mais abundantes no intestino são acetato, propionato e butirato, derivados principalmente de carboidratos (Fig.4) (WIKOF et al., 2009). Utilizado localmente como fonte de energia pelas células epiteliais do cólon, os SCFAs são cruciais para a manutenção da integridade da barreira intestinal pela regulação da expressão de proteínas de junção estreita, bem como na manutenção da imunidade e do metabolismo do organismo (MACFARLANE et al., 2011; WIKOF et al., 2009). Outros importantes produtos da fermentação bacteriana são os metabólitos derivados do catabolismo dos aminoácidos aromáticos, a exemplo do triptofano, que também desempenha um papel

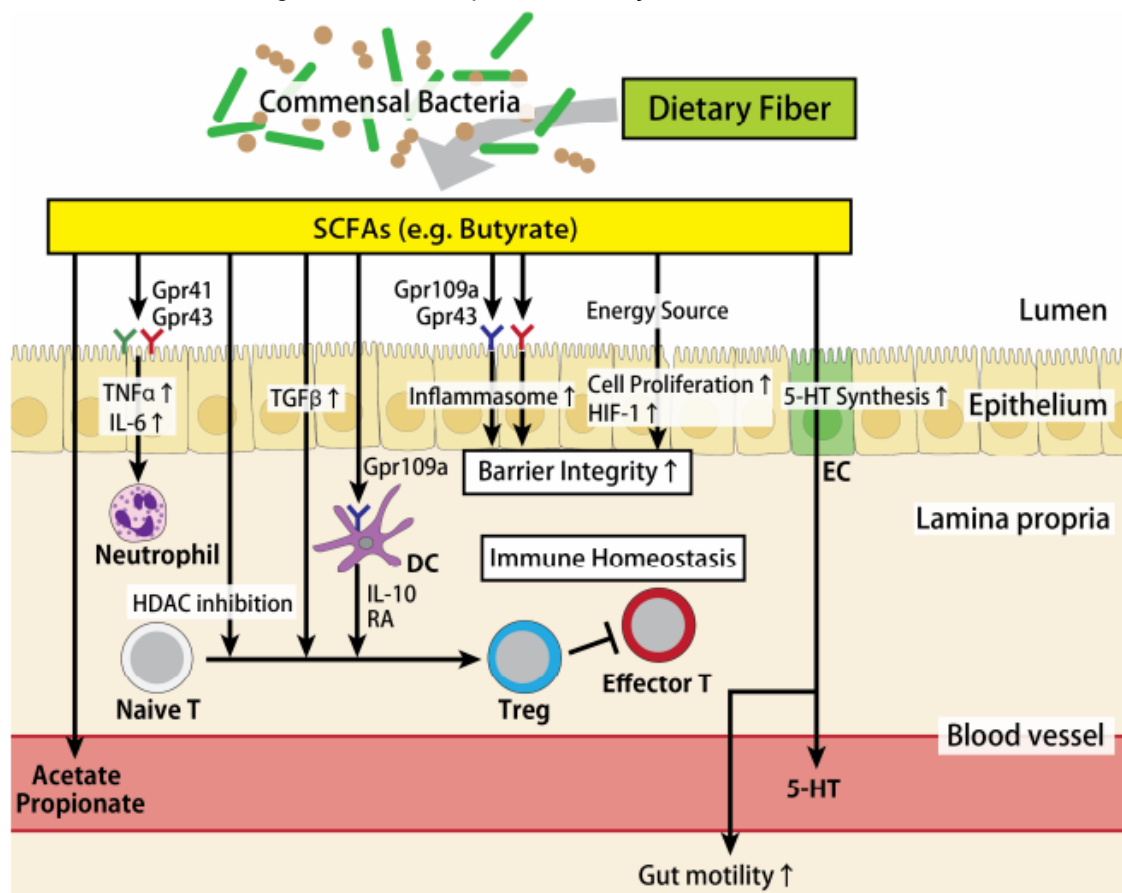
importante na regulação dos ácidos biliares por meio de processos de desconjugação microbiana de gorduras da dieta. Estes metabolitos derivados do colesterol facilitam a absorção intestinal dos lípidos e vitaminas lipossolúveis, enquanto sua taxa de síntese influencia os níveis sistêmicos de colesterol (KRISHNAN et al., 2015; MACFARLANE et al., 2011; WIKOF et al., 2009).

Estudos recentes detectaram SCFAs e muitos outros metabólitos derivados de microbiotas bioativos na circulação sistêmica que constituem meios de comunicação neuro-humoral ligando o intestino a outros órgãos. O que leva a modulação de funções cruciais do corpo humano saudável, variando do metabolismo do hospedeiro a funções fisiológicas (KRISHNAN et al., 2015; WIKOF et al., 2009).

Existem várias linhas de evidências que conectam a microbiota intestinal e o sistema nervoso central (SNC) (MARIETTA et al., 2018). A microbiota estimula o nervo vago a enviar sinais ao SNC e induz células enterocromafins a produzir hormônios gastrintestinais, como peptídeo YY, CCK E 5-HT (QIN et al., 2010; MARIETTA et al., 2018). Alguns microorganismos da microbiota podem estar relacionados na produção de neurotransmissores, como por exemplo, o triptofano derivado da fermentação pelo *Clostridium* spp para produzir o neurotransmissor triptamina (WILLIAMS et al., 2014). Embora o papel fisiológico de triptamina derivada de *Clostridium* ainda não ter sido esclarecido, estudos sugerem que esse neurotransmissor estimula a secreção de íons colônicos, o que pode afetar a motilidade gastrintestinal. A 5-hidroxitriptamina (5-HT; serotonina) é outro neurotransmissor e hormônio que é produzido principalmente no intestino e que regula a secreção intestinal e a motilidade (GERSHON et al., 2007). Estudos recentes revelaram que a microbiota intestinal aumenta a produção de 5-HT por células enterocromafins (ECs) através da ação de metabolitos derivados da microbiota, incluindo SCFAs, desoxicolato e *p*-aminobenzoato (REIGSTAD et al.; YANO et al., 2015) (Fig 4).

Figura 4: Efeitos mediados por SCFAs de bactérias comensais no intestino (**Fonte:** YAMADA et al., 2016).

Bactérias comensais geram SCFAs por fermentação de fibras alimentares. Os SCFAs,



especialmente pelo butirato, Aumento da acetilação da histona H3 e as regiões estimuladoras do SNC3 do gene Foxp3 nas células T CD4 + naïve. O butirato também induz células dendríticas (DCs) a produzir ácido retinóico (AR) e IL-10. Esses efeitos promovem de forma coordenada a diferenciação das células Tregs das células T CD4 naïve e contribuem para a homeostase imune intestinal. Nas células do epitélio intestinal (IECs), os SCFAs, ativam a via de sinalização Gpr43 ou Gpr109a. Além disso, os SCFAs, estabilizam o fator induzido por hipóxia (HIF) -1 e aumentam a proliferação celular como fonte de energia, levando ao aumento da barreira IEC. Os SCFAs aumentam a produção de 5-HT pelas células enterocromafins (ECs) e aumentam os níveis de 5-HT no cólon e no sangue.

Assim, embora o papel das bactérias intestinais na modulação da resposta imune sistêmica e da fisiologia intestinal seja amplamente discutido, os efeitos de outros microrganismos comensais são desconhecidos (KIM et al., 2014).

Apenas nos últimos dez anos é que o microbioma humano vem sendo considerado como um novo conceito microbiológico, que engloba a pesquisa de

todos os microrganismos (bactérias, fungos, arqueias e vírus) como componentes da microbiota de um determinado sítio anatômico. Em 2010 o termo micobioma foi utilizado pela primeira vez para se referir ao micobioma fúngico (CUI et al., 2013).

Existem diversas razões para incluir o estudo da participação dos fungos na constituição da microbiota das diferentes partes do corpo, como: (I) a incidência de infecções fúngicas tem aumentado significativamente nas duas últimas décadas, principalmente as oportunistas, com o crescimento do número de indivíduos imunossuprimidos, infectados pelo vírus HIV e transplantados ou em quimioterapia para câncer; (II) doenças que eram consideradas como não associadas a fungos, hepatite, fibrose cística e doenças intestinais inflamatórias, hoje parecem estar relacionadas ao micobioma de determinados locais e (III) a interação entre os diferentes biomas e entre o hospedeiro e o micobioma (CUI et al., 2013).

Com base em estudos de cultivo, estima-se que o número total de microrganismos fúngicos seja de 10^1 a 10^2 unidades formadoras de colônias (CFUs)/mL na cavidade oral e aumente para até 10^6 UFC/mL nas fezes. Atualmente, 390 espécies diferentes de fungos foram detectadas na microbiota humana pertencentes aos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (OTT et al., 2008).

O micobioma do TGI de indivíduos saudáveis é formado pelos gêneros *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Pneumocystis*, *Fusarium*, *Candida* e *Saccharomyces* (HOFFMAN et al., 2011). Em um segundo estudo, Hoffmann e colaboradores (2013) utilizaram o sequenciamento profundo para avaliar a microbiota intestinal e relataram a presença de 12 gêneros fúngicos. Como esperado, os gêneros fúngicos mais prevalentes detectados foram *Saccharomyces* (presente em 89% dos espécimes), seguido por *Candida* (57%) e *Cladosporium* (42%).

Anteriormente, acreditava-se que o ácido gástrico poderia matar os microrganismos que entravam no estômago, não ocorrendo nenhuma possível colonização ou infecção bacteriana nesse meio. No entanto, vários estudos usando métodos independentes de cultura confirmaram que existe no estômago

um grande número de bactérias resistentes ao ácido pertencentes a filos de até 120 espécies, como *Streptococcus sp.*, *Neisseria sp.* e *Lactobacillus ssp* (WANG et al., 2014). Além disso, a *Candida albicans* pode crescer bem em ambientes altamente ácidos (ZWOLINSKA et al., 2001), e alguns genomas podem aumentar a gravidade das lesões da mucosa gástrica (GONG et al., 2012).

Ainda não está claro se fungos ou bactérias gástricas, além da *Helicobacter pylori* participam da patogênese de doenças gástricas (por exemplo, úlceras e câncer, etc.). Entretanto tem visto que a coexistência de *C. albicans* com *H. pylori* poderia apresentar sinergia na patogênese das úlceras pépticas (KARCZEWSKA et al., 2009). As distribuições reais de microorganismos gástricos em várias desordens ainda precisam ser confirmadas, uma vez que a microflora na mucosa gástrica e nos conteúdos estomacais ainda não foram exaustivamente estudados (WANG et al., 2014).

Distúrbios na microbiota podem resultar em comprometimento da barreira intestinal, sistema imunológico desregulado e metabolismo alterado do tecido, mecanismos que têm sido implicados no desenvolvimento de doenças gastrointestinais a exemplo das doenças inflamatórias intestinais (doença de chron e colite ulcerativa) (OTT et al., 2008; SANTELMANN et al., 2005), úlceras pépticas (RAMASWAMY et al., 2007) e diarreia, podendo ser associada a antimicrobianos, ao uso de quimioterápicos e infecções por indivíduos imunodeprimidos com HIV/AIDS (KRAUSE et al., 2005; STRINGER et al., 2009).

1.2.2. Diarreia

A diarreia é definida como um distúrbio do trato gastrointestinal que se caracteriza pelo aumento da frequência de fezes soltas ou aquosas por três ou mais vezes durante um período de 24 horas resultante de um movimento rápido do material fecal pelo intestino. Essa afecção caracteriza-se por ser um distúrbio secretório, absorptivo e da motilidade. A redução da eficiência de absorção pode ser devido a alterações na função na mucosa e no trânsito gastrointestinal, sendo suficiente para frequência de formação de fezes mais fluidas, com ou sem a presença de sangue e muco, levando a perda de água e eletrólitos (OLASUPO et al., 2017; SCHILLER et al., 2012; WHO 2016).

Esse distúrbio é de etiologia multifatorial, podendo ser devido a taxas de alteração dos processos absorptivos e secretórios, em resposta a danos na mucosa absorvente como microorganismos enteropatogênicos, que são responsáveis por infecções gastrointestinais, produzidos por *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholera*, *Giardia Intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, vírus do HIV, Rotavírus e Adenovírus (HIMANSHU et al., 2016; YAKUBU et al., 2015; JOURET-MOURIN et al., 2002). Além disso, outros fatores causais como ingestão de álcool, síndrome do intestino irritável, sais biliares, hormônios, tumores secretórios, intoxicação alimentar e função nervosa entérica (BARKUN et al., 2013; HIMANSHU et al., 2016; UNICEF/WHO 2009).

A eficiência absorptiva reduzida também pode ser devido ao trânsito rápido pelo intestino, má absorção ou má digestão, ou alterações cirúrgicas que remove regiões críticas intestinais, como o íleo terminal, assim como, uso de uma terapia com antirretrovirais, antineoplásicos, e antimicrobianos que alteram a microbiota normal e está associada a sintomas clínicos como a diarreia, que ocorre em até 30% dos usuários. O uso de outros medicamentos como metformina, inibidores da bomba de prótons, β -bloqueadores, AINES entre outros são potenciais causadores de diarreia (LAWRENCE et al., 2017; SCHILLER et al., 2015; PHILPOTT et al., 2015).

A severidade desta doença é agravada pela manipulação de água contaminada, desnutrição, falta de higiene na lavagem das mãos, condições ambientais precárias, como a falta de saneamento básico e de acesso a cuidados de saúde primária (OLASUPO et al., 2017; GERALD et al., 2006; HEMPEL et al., 2017; BARBUT et al., 2002; SZAJEWSKA et al., 2003).

Segundo a OMS (2017) a diarreia é a segunda principal causa de morbidade e mortalidade em crianças a cada ano com menos de cinco anos de idade. De acordo com Liu e Colaboradores (2015) em 2015, ocorreu 5,9 milhões de óbitos ocorreram em crianças em até cinco anos em todo o mundo. Os sintomas foram causados por doenças infecciosas e condições como pneumonia, diarreia e sarampo (LIU et al., 2015). Devido às condições de subsistência não higienistas, a população de países em desenvolvimento é muito

mais propensa a várias doenças comuns, incluindo a diarreia (RAHMAN et al., 2015).

O rotavírus é a principal causa de diarreia secretória grave em lactentes e crianças jovens em todo o mundo, resultando em aproximadamente 0,5 milhão de mortes por ano em crianças menores de 5 anos, o que representa cerca de um terço das mortes atribuídas à diarreia (TATE et al., 2012).

A incidência de outras diarreias virais, notadamente as causadas por norovírus, HIV e outros calcivírus e astrovírus, aumentou recentemente e pode estar substituindo o rotavírus como principal causa de diarreia viral na infância nos países desenvolvidos (PAYNE et al., 2013). Essa afecção mata mais crianças do que AIDS, malária e sarampo combinados (EDLAM et al., 2017; WHO, 2013; BARTOLOME et al., 2013).

No Brasil, entre 2000 e 2011, foram notificados 33 milhões de casos de diarreia, a maioria em menores de 5 anos de idade. E no ano de 2010, mais de 850 crianças dessa faixa etária morreram em decorrência da diarreia (BRASIL, 2012). No Distrito Federal (DF) foram contabilizados 558.737 casos de diarreia, com maior incidência entre crianças menores de 1 ano, no período de 2003-2012 (MENEGUESS et al., 2015). Já no semiárido brasileiro mais de 100 mil pessoas foram acometidas com diarreia no ano de 2013, principalmente os estados de Alagoas e Pernambuco. (RUFINO et al., 2016).

A diarreia pode ser classificada de acordo com tempo de duração em aguda ou crônica (RUI; FANG, 2012). Esse distúrbio é considerado agudo quando a perda de consistência das fezes e o aumento anormal da frequência de evacuação dura até 1 semana e em crônica quando essa desordem dura mais de 14 dias (BARRACA; HERBERT et al., 2016). Além disso a diarreia aguda é causada principalmente por patógenos entéricos, incluindo vírus, bactérias e parasitas, enquanto a maioria dos casos de diarreia crônica resulta de distúrbios intestinais funcionais ou inflamatórios, síndromes de má absorção e uso de medicamentos (FISCHER et al., 2013).

De acordo com o mecanismo fisiopatológico, a diarreia pode ser dividida em osmótica, secretória, exsudativa ou inflamatória e por alterações na motilidade (FERNÁNDEZ-BANARES et al., 2015).

A diarreia osmótica é decorrente de uma má digestão dos solutos pelo intestino que exercem então retenção osmótica (FERNÁNDEZ-BANARES et al., 2015). No tipo secretório, O sintoma típico é a secreção excessiva de líquido, resultado do desequilíbrio do transporte de água e eletrólitos no lúmen intestinal, aumento da secreção de fluido e redução da absorção intestinal (DANTAS, 2004; VEL´AZQUEZ et al., 2009; TADESSE et al., 2014). A secreção de cloreto no lúmen intestinal gera um gradiente eletroquímico que, conduz a passagem por movimentos secundários de sódio e água pela via paracelular (THIAGARAJAH et al., 2004; 2012). A secreção de cloreto envolve a ativação do (s) canal (es) de cloreto na membrana plasmática apical dos enterócitos. A força eletroquímica para a secreção de cloreto de membrana apical é estabelecida por transportadores de membrana basolateral, incluindo a ATPase de sódio-potássio, o cotransportador de cloreto de sódio-potássio (NKCC1) e o (s) canal (es) de potássio. Nas diarreias secretoras causadas por bactérias, como a cólera (*Vibrio cholerae*) e a diarreia dos viajantes (*Escherichia coli* enterotoxigênica), as enterotoxinas bacterianas segregadas ativam canais de cloreto de membrana apical, resultando em secreção de cloreto. O canal de cloreto primário ativado por enterotoxinas bacterianas é o CFTR, um canal de cloreto ativado com AMPc. (THIAGARAJAH et al., 2012; KO et al., 2013).

A diarreia exsudativa ou inflamatória caracteriza-se pela presença de leucócitos, muco, sangue e pus nas fezes, além de febre e perda de peso (BARRACA, 2016). Já a diarreia motora envolve o aumento do trânsito intestinal causando a inadequada mistura do alimento para ação das enzimas digestivas, e diminuindo o contato com a superfície intestinal, diminuindo assim o processo absorptivo, devido ao ressecamento intestinal ou o aparecimento de fístulas entéricas (BARRACA, 2016).

A terapêutica da diarreia é inespecífica e está centrada no tratamento de sinais e sintomas clínicos, focada na redução do desconforto, desidratação e incômodo causado por evacuações frequentes (CHOI et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015). Didaticamente o tratamento pode ser dividido em uma terapia farmacológica e não farmacológica.

A terapia de sais de reidratação oral (SRO), compreende a terapia não farmacológica e está focada em indivíduos com diarreia aguda evitando a

desidratação e a depleção de eletrólitos. Essa terapia melhora a absorção de fluidos e eletrólitos estimulando a absorção de sódio mediada por glicose e aminoácidos. Entretanto, essas soluções não reduzem a quantidade ou a frequência de fezes e os indivíduos geralmente desejam alívio sintomático adicional, necessitando assim de uma terapia farmacológica (HIMANSHU et al., 2016; SAHOO et al., 2014).

Mais recentemente, a suplementação de zinco mostrou ser um complemento importante para as SRO, reduzindo a duração e a gravidade dos episódios de diarreia (WALKER et al., 2010; GRELAND et al., 2016). A utilização de suplemento de zinco por 10-14 dias pode também reduzir a incidência subsequente de diarreia (WALKER et al., 2010). A OMS e UNICEF recomendaram suplementos de zinco e SRO para o tratamento rotineiro da diarreia aguda da infância desde 2004 (WALKER et al., 2009), embora tenha sido estimado que a cobertura universal e o uso de SRO e zinco na terapêutica podem prevenir três quartos da mortalidade associada à diarreia (JONES et al., 2003).

A terapia farmacológica compreende uma série de medicamentos antidiarreicos que podem ser amplamente definidos como agentes que minimizam os sintomas de diarreia, por atuarem no trânsito e no transporte intestinal ou na viscosidade das fezes, melhorando assim a consistência ou reduzindo o peso das fezes, como também reduzindo a frequência de defecação no trânsito intestinal, o que resulta em melhora sintomática em uma variedade de condições (LAWRENCE et al., 2017; SCHILLER et al., 1995).

Dentre as principais classes de medicamentos utilizadas na terapêutica estão os agentes higroscópicos e formadores do bolo fecal (coloides ou polímeros hidrofílicos pouco fermentáveis, a exemplo da caboximetilcelulose e a polycarbofila), sequestradores dos ácidos biliares (colestiramina), compostos a base de bismuto (salicilato de bismuto), agonistas dos receptores α -2 adrenérgicos e antagonistas muscarínicos, a exemplo da clonidina e atropina, respectivamente e por fim os antissecretórios e supressores da motilidade que são os pilares no tratamento da diarreia. Os opioides e seus derivados continuam sendo amplamente utilizados nesta terapêutica (loperamida, difenoxilato) (BRUNTON et al., 2011; KATZUNG, 2014; MEKONNEN et al., 2018).

A loperamida é um agonista de receptores opióides de baixa potência, que é pouco absorvido do intestino e não atravessa bem a barreira hematoencefálica (GALLIGAN et al., 2014). Atuam nos receptores μ e δ , inibem a liberação de acetilcolina no plexo mioentérico e bloqueiam as contrações peristálticas induzidas por distensão, reduzindo a excitabilidade neuronal. O tônus muscular é alterado e os padrões de motilidade não propulsora se tornam mais comuns (LAWRENCEET al., 2017; HOLZER et al., 2009; BAKER et al., 2007). A dose de tratamento deste medicamento é de 2-8 mg por dia, tendo poucos efeitos colaterais (REGNARD et al., 2011). Em menos de 5% dos indivíduos ocorre constipação, cólicas abdominais, náuseas e tonturas. Depressão respiratória e íleo paralítico estão entre os efeitos colaterais perigosos da loperamida observada em crianças (ZARGHAMI et al., 2017). Entretanto, esta terapêutica apresenta fatores limitantes tais como os efeitos adversos, como boca seca, dor abdominal, vômito, náusea e tontura. e efeitos colaterais como gosto metálico, eosinofilia, falta de ar e erupções da cutâneas (ANVISA, 2015; SEBAI et al. 2014; SHARMA, SHARMA, 2007).

Dessa forma, a busca por novas alternativas terapêuticas que sejam mais eficazes, mais seguras e com menos efeitos colaterais do que os medicamentos que estão disponíveis no mercado, faz dos produtos naturais, a exemplo das plantas medicinais, uma excelente estratégica terapêutica, por sua riqueza de constituintes e variedade de substâncias biologicamente ativas (BRAZ-FILHO, 2010; NEWMAN, 2007).

1.2.3 Produtos naturais

Os produtos naturais são substâncias obtidas de organismos vivos como animais (marinhos ou terrestres), microrganismos (bactérias e fungos) e plantas que possuem uma grande variedade de atividades biológicas no desenvolvimento de novos fármacos (DUTRA et al., 2016; KUMAR et al., 2014).

As plantas medicinais têm sido uma das principais fontes de matérias primas, para o desenvolvimento de moléculas bioativas como alvos para estudos farmacológicos, toxicológicos e fitoquímicos destinados à síntese de fármacos para o tratamento de diversas doenças (MARIATH et al., 2009).

A indústria farmacêutica, a indústria farmacêutica apresenta um grande potencial econômico de bioprospecção, para a descoberta de um novo fármaco que provenha diretamente da biodiversidade, ou por processos de síntese a partir dos recursos genéticos ou bioquímicos da biodiversidade (ENRÍQUEZ, 200), tem ressurgido na tentativa de prospecção por alternativas terapêuticas mais seguras, com menos efeitos colaterais, sem recidivas, com menor custo e consequentemente maior acessibilidade pela população, favorecendo o crescimento econômico e o desenvolvimento das cadeias produtivas da biodiversidade (BANSAL; GOEL, 2012). Cerca de 20% das plantas originárias da Terra foram utilizadas pela indústria farmacêutica, e um número razoável de novos produtos à base de plantas vem sendo introduzidos em diversas especialidades de doenças (BORAH et al., 2017).

No Brasil, muitas classes de princípios ativos vem sendo isoladas de plantas medicinais, uma vez que o país tem a maior biodiversidade mundial, concentrando cerca de 20-22% da flora do planeta, representando mais de 45 mil espécies de plantas (DUTRA et al., 2016). Este contexto reflete a utilização de produtos medicinais a base de plantas na medicina popular em diversas enfermidades por grande parte da população brasileira. Esta terapêutica tão presente entre os brasileiros, tornou-se de interesse da comunidade científica que ao longo de 28 anos publicou aproximadamente 34614 estudos sobre plantas que envolvem principalmente a detecção, isolamento e avaliação toxicológica de seus componentes ativos (DUTRA et al., 2016; NEWMAN et al., 2013).

Desde as primeiras civilizações, as plantas medicinais desempenharam um papel inestimável no tratamento de diversas enfermidades. Atualmente, estima-se que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento ainda conta com a medicina tradicional para seus cuidados de saúde primários (MEKONEEN et al., 2017; PATHAK et al., 2013).

A maioria das pessoas que vivem em países em desenvolvimento confiam na medicina tradicional para tratar diferentes doenças, incluindo diarreia (RAMAWAT, 2009).

Existe um grande número de plantas medicinais em todo o mundo que são considerados eficazes no tratamento da diarreia, como: *Amaranthus caudatus*, *Cofea arabica*, *Balanites rotundifolia*, *Boscia coriacea*, *Cissampelos pareira*, *Cissampelos synpodialis*, *Plumbago zeylanica*, *Solanum hastifolium*, *Berberis crataegina*, *Cornus mas*, *Ecballium elaterium*, *Mentha longifolia*, *Rhamnus catártica*, *Teucrium polium*, *Justicia schimperiana*, *Maytenus erythroxylon* Reissek, *Psidium guajava* e *Anacardium occidentale* L. (ABERA et al., 2014; ALTUNDAG et al., 2011; ARAÚJO et al., 2015; FORMIGA et al., 2017; JALILZADEH-AMIN et al., 2015; MEKONNEN et al., 2018; NDUKU et al., 2013 ; OWEJOLE et al., 2008 ; SALES et al., 2014; TEKLEHAYMANOT et al., 2010)

Existem muitas plantas medicinais que possuem atividade antidiarreica com menos efeitos colaterais do que as drogas convencionais. Como responsáveis por essa atividade estão uma diversidade de metabólitos secundários, como: taninos, alcaloides, flavonoides e terpenoides que são os responsáveis pela atividade antidiarreica dessas ervas medicinais (MEHONEN et al., 2017; KOMAL et al., 2013).

1.2.3.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis contidas em órgãos de plantas, e assim são denominados devido à composição lipofílica que se apresentam quimicamente diferente da composição glicerídica dos verdadeiros óleos e gorduras (BAKKALI et al. 2008). Esta diferença está relacionada a algumas características físico-químicas dos mesmos, como, por exemplo, geralmente serem líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente, serem voláteis e apresentarem aroma agradável. De coloração, odor e viscosidade variados, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada em água e geralmente apresentam densidade menor (BAKKALI et al. 2008; SIANI et al., 2000).

Os óleos estão associados a várias funções necessárias a sobrevivência do vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, como também atraindo insetos e outros seres vivos (BAKKALI et al. 2008; SIANI et al., 2000).

Quimicamente, a maioria dos óleos voláteis é constituída por substâncias terpênicas (composta frequentemente por mais de 100 compostos terpênicos diferentes) e fenilpropanóidicos, podendo ser acrescidos de outras classes de compostos, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curtas (ASBAHANI et al., 2015). Dentre os compostos terpênicos, os mais frequentes são os monoterpenos com propriedades terapêuticas, como antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias e atividades biocidas (bactericidas, viricidas e fungicidas) (ASBAHANI et al., 2015; SOUSA 2011; GUIMARÃES et al. 2013). Alguns dos principais compostos incluem hidrocarbonetos monoterpenos (como limoneno, *p*-cimeno, α -pineno e α -terpineno) e monoterpenos oxigenados (como carvacrol, timol e cânfora) (NAZZARO et al., 2017). Vários estudos têm destacado os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais mesmo contra bactérias multirresistentes (ASBAHANI et al., 2015; BURT, 2004; MAYAUD et al., 2008).

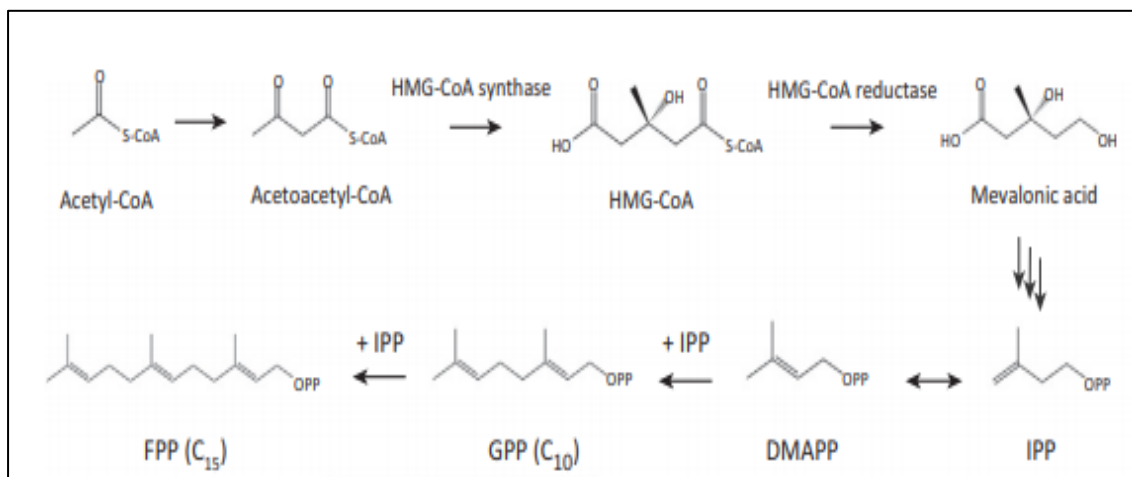
Para este trabalho foi selecionado o *p*-cimeno, um monoterpeno, que está presente em uma variedade de óleos essenciais de mais de 100 espécies de plantas gimnospermas e angiospermas (BENCHAAR et al., 2008).

1.2.3.2 Terpenos

Os terpenos formam classes estruturalmente e funcionalmente diferentes. Eles são feitos de combinações de várias unidades de 5 carbonos (C5) chamadas isopreno (Fig. 5). A biossíntese dos terpenos consiste na síntese do precursor de isopentenil difosfato (IPP) e o isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), pela via mevalônica. Nesta via, duas moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA) condensam para produzir acetoacetil-CoA. Em seguida, adiciona-se acetil-CoA a acetoacetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é catalisada pela enzima HMG-CoA sintase. O ácido mevalônico é gerado pela HMG-CoA redutase. Este ácido mevalônico de seis carbonos é transformado no IPP de cinco carbonos após uma série de reações, nomeadamente uma fosforilação em dois passos do álcool primário, posterior fosforilação da hidroxila terciária, seguida de descarboxilação e perda de fosfato. O IPP é isomerizado para gerar DMAPP. A adição de IPP ao seu isômero DMAPP gera geranil

difosfato (GPP). A condensação de GPP com unidades adicionais de IPP forma maiores difosfatos em prenilo - farnesil difosfato (FPP) e geranilgeranil difosfato (GGPP) que serão os precursores das várias classes de terpenos (Fig. 5) (WAWRZYN et al., 2012; XIAO et al., 2016).

Figura 5. Visão Geral da Biossíntese de Terpenos pela via do Mevalonato (Fonte: XIAO et al., 2016).



Abreviaturas: Acetil-CoA, acetil-coenzima A; DMAPP, difosfato de dimetilalilo; FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranilgeranil difosfato; GPP, difosfato de geranil; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; IPP, difosfato de isopentenil.

Entre as principais classes de terpenos tem-se os monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (XIAO et al., 2016).

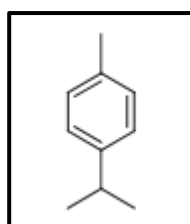
Um terpeno contendo oxigênio é chamado de terpenoide. Os monoterpenos representam um grande grupo de compostos orgânicos que ocorrem naturalmente, cuja estrutura básica consiste em duas unidades de isopreno ligadas (BAKKALI et al., 2008; XIAO et al., 2016).

Os terpenos são as moléculas mais representativas, constituindo 90% dos óleos essenciais e possuem grande variedade de estruturas (BAKKALI et al. 2008). Essas biomoléculas classicamente já possuem efeitos promissores no TGI e alguns já apresentaram atividade antidiarreica e efeitos sobre a motilidade, como os sesquiterpenos dehidroleucodina e epoxi-tujeno (WENDEL et al., 2008), os triterpenos friedelan-3β-ol, friedelina, volvalerenol A (QUEIROGA, 2000; BASHIR et al., 2011) e o monoterpeno zingerona (IWAMI, 2011).

1.2.3.3. Constituinte ativo selecionado para estudo: *p*-cimeno

O *p*-cimeno (*p*-isopropiltolueno), (Fig.6), é um composto orgânico aromático, sendo classificado como um hidrocarboneto da classe dos monoterpenos, precursor do carvacrol e um dos principais constituintes do óleo essencial das espécies do gênero *Potrium*, com mais de 80% de suas espécies encontradas na região da Amazônia (SANTANA et al., 2011).

Figura 6: Estrutura química do *p*-cimeno (Fonte: SANTANA et al., 2011).

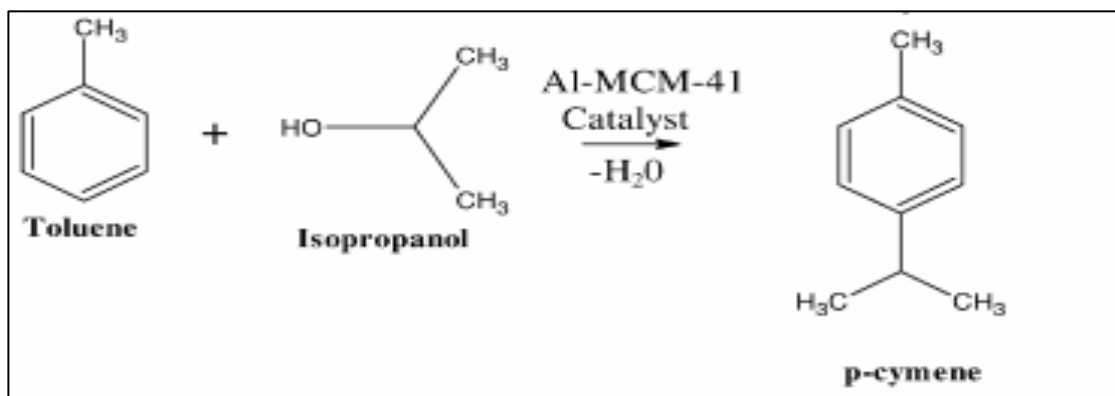


Esta substância também é encontrada em mais de 200 alimentos como: framboesas, tangerina, cenoura, manteiga, suco de laranja, uva, noz-moscada, orégano, e em quase todas as especiarias (QUITANS et al., 2013).

O *p*-cimeno também pode ser de origem sintética, derivado do tolueno a partir de uma reação de alquilação junto ao isopropanol (Fig. 7). Esse monoterpeno é um intermediário importante utilizado nas indústrias farmacêuticas e para a produção de fungicidas, pesticidas e agentes aromatizantes (PARIKH et al., 1992; SELVARAJ et al., 2002).

Estudos farmacológicos mostram que o *p*-cimeno apresenta atividade analgésica, anti-inflamatória (BONJARDIM et al., 2012; QUITANS et al., 2013), antinociceptiva (SANTANA et al., 2011), antitussígena e mucolítica (JOGLEKAR et al., 2014) e antimicrobiana (KEDIA, 2013; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010).

Figura 7: Reação de isopropilação do tolueno (Fonte: SELVARAJ et al., 2002)

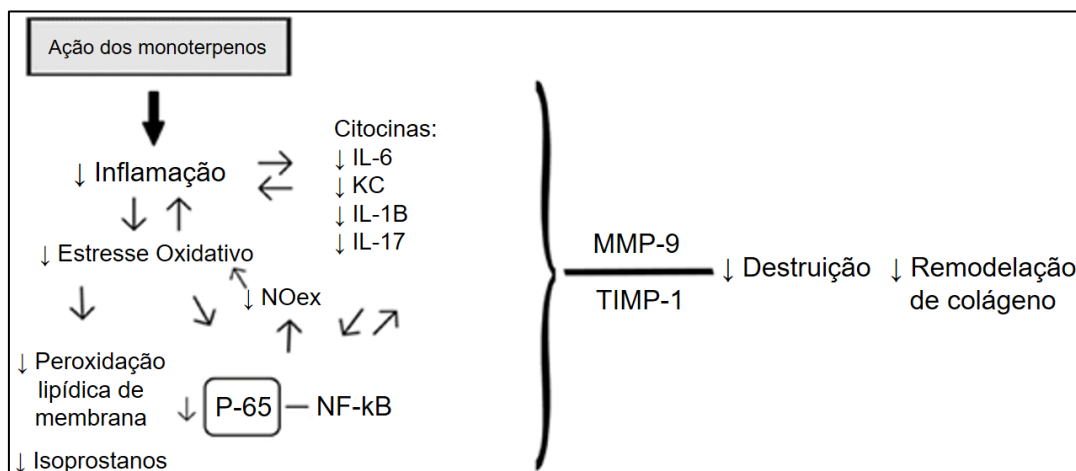


A isopropilação do tolueno com isopropanol é uma reação de substituição eletrofílica no anel aromático, reação esta catalisada por moléculas de mesoporos contendo alumínio (Al-MCM-41).

Os monoterpenos (entre eles o *p*-cimeno) reduzem o processo inflamatório e o estresse oxidativo em ratos com efisema pulmonar por meio da diminuição significativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), quimiocina KC, fator de transcrição NF- κ B, e isoprostano evitando a remodelação pulmonar ocorrida pelo desequilíbrio entre as metaloproteinases de matriz (MMP) e os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) e a deposição de colágeno, reforçando assim, o seu potencial anti-inflamatório e antioxidante, como demonstrado na Figura 8 (GAMES et al., 2016; ZHONG et al., 2013)

Um estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2015) mostrou que o *p*-cimeno possui atividade antioxidante por aumentar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e diminuir significativamente os níveis de peroxidação lipídica e formação teor de nitrito no hipocampo de ratos. Já Chen e colaboradores (2014) mostrou que além dos parâmetros descritos acima o *p*-cimeno diminuiu a quantidade de radicais livres de hidrogênio.

Figura 8: Mecanismo de ação antiinflamatória e antioxidante do *p*-cimeno
(Fonte: Adaptado de GAMES et al., 2016)



IL-6: interleucina 6; KC: quimiocina KC; IL-1b: interleucina 1 beta; IL-17: interleucina 17;
NOex: óxido nítrico exalado; P-65: subunidade do NF-κB; NF-κB: fator de transcrição NF-κB; MMP-9: metaloproteinase de matriz; TIMP-1: inibidor tecidual de metaloproteinase.

Resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, avaliaram atividade gastroprotetora em modelos de indução aguda de úlcera (etanol, estresse e AINE), ligada à participação dos grupamentos sulfidrilas e do óxido nítrico (NO) (LEITE, 2014), antiulcerogênico em modelos de úlcera induzido por ácido acético e anti-inflamatória em modelos experimentais de colite ulcerativa (FORMIGA, 2017). Esses resultados estimulam a continuidade dos estudos com o *p*-cimeno frente a outras afecções do TGI, a exemplo da diarreia.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antidiarreica, os efeitos sobre a motilidade gastrintestinal e possíveis mecanismos relacionados a ação do *p*-cimeno, bem como a ação antimicrobiana do mesmo em modelos experimentais.

2.2 Específicos

- ✓ Avaliar o efeito do *p*-cimeno no modelo de indução de diarreia por óleo de rícino;
- ✓ Avaliar o efeito do *p*-cimeno na motilidade gastrintestinal: esvaziamento gástrico e trânsito intestinal;
- ✓ Avaliar os mecanismos relacionados a ação antimotilidade (Sistemas adrenérgico, nitrérgico e KATP);
- ✓ Avaliar o mecanismo antissecretório do *p*-cimeno na acumulação intraluminal de fluido (Enteropooling).
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica do *p*-cimeno.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Material de estudo (*p*-cimeno)

O *p*-cimeno (*p*-isopropiltolueno) foi adquirido da SIGMA-ALDRICH Brasil Ltda (referência do produto: C121452 e Lote MKBK4439V), pureza de 99%, densidade de 0,86 g/mL a 25°C, CAS: 99-87-6, Massa molecular de 134,22, ponto de ebulição 176°C-178°C e ponto de fusão 47°C.

3.1.2. Animais

Par realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) albinos machos, pesando entre 25 a 35 gramas, provenientes da unidade de produção animal Prof. Thomas George do IPeFarm/UFPB mantidos a 23 ± 2 °C e ciclos claro-escuro de 12/12 horas. Os animais foram alimentados com ração labina, água à vontade e distribuídos ao acaso nos diferentes grupos experimentais sendo cada grupo composto de sete animais (grupo controle negativo, controle positivo e quatro doses das drogas a serem testadas). Os períodos de jejum estão de acordo com o preconizado para cada uma das metodologias empregadas. Os quais foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com os animais de laboratório e obedecendo aos protocolos experimentais aprovados, previamente, pelo Comitê Institucional de Ética em Uso Animal – (CEUA/UFPB).

3.1.3. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade biológica foram Brain Heart Infusion (BHI), Agar Sabouraud Dextrose (ASD)-adquiridos da Difco Laboratories Ltd, USA, France, para manutenção das cepas. e caldo Brain Heart Infusion (BHI)/bactérias e meio RPMI 1640/com L-glutamina e sem bicarbonato/fungos para os ensaios de atividade biológica (Difco

Laboratories Ltd, USA, France e INLAB, São Paulo, Brasil). Todos foram preparados conforme as descrições dos fabricantes.

3.1.4. Microorganismos

Para os ensaios de atividade biológica dos produtos testes, foram utilizadas as seguintes cepas:

- Bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC-13150, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853, *Escherichia coli* ATCC-18739, *Salmonella enteritis* ATCC-6017;
- Fungos leveduriformes: *Candida albicans* ATCC-76485; *C. tropicalis* ATCC-13803; *C. parapsilosis* ATCC-22019, *Cryptococcus neoformans* ATCC-6258;
- Fungos filamentosos: *Aspergillus fumigatus* ATCC-40640; *Penicillium citrinum* LM-278, *Fusarium oxysporum* URM-5893; *Cladosporium carionii* LM-283

Os micro-organismos pertencem a MICOTECA do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em BHI/bactérias e em ASD/fungos à temperatura de 4°C. Para os ensaios, foram utilizados repiques de 24 - 48 horas em BHI/ASD, respectivamente, para bactérias e leveduras, incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e repiques de 7 - 14 dias em ASD para fungos filamentosos, incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.1.4.1 Inóculo

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas das cepas de bactérias/BHI e fungos/ASD, foram suspensas em solução fisiológica a 0,9 % estéril e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de Mc Farland para obtenção de 10^6 UFC/mL (CLSI, 2015; CLSI^A, 2008; HADACECK; GREEGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991; ANTUNES et al., 2006; FREIRE et al., 2014).

3.1.5. Locais da Pesquisa

Os experimentos foram realizados nos Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal (IPeFarm/UFPB) e no Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, vinculados ao programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do CCS/UFPB, sob orientação da da Profa. Dra. Leônia Maria Batista e da Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, respectivamente.

3.2. Metodologias experimentais

3.2.1. Avaliação da atividade antidiarreica e de efeitos na motilidade gastrointestinal

3.2.1.1. Diarreia induzida por óleo de rícino

Para avaliação da atividade antidiarreica do *p*-cimeno será utilizado um modelo preconizado por Awouters et al., 1978. Camundongos Swiss machos (n=7), em jejum 12h, foram tratados por via oral com o veículo (tween 80 5%; 10 mL/kg), loperamida (5 mg/kg) e *p*-cimeno nas doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg. Após 1h, foi administrado por v.o 10 mL/kg de óleo de rícino. Os animais foram colocados isoladamente em caixas com piso forrado com papel para análise dos bolos fecais. A severidade da diarreia foi observada durante 4h, analisando os parâmetros índice de evacuação (formados ou sólidos, semissólidos ou pastosos e líquidos), percentual de fezes líquidas e o percentual de inibição da diarreia.

Índice de Evacuação: $\sum (\text{fezes sólidas} \times 1) + (\text{fezes líquidas} \times 2) + (\text{fezes líquidas} \times 3)$

3.2.1.2. Avaliação de efeitos no esvaziamento gástrico

Para avaliação do efeito do *p*-cimeno sobre o esvaziamento gástrico foi utilizado o modelo padronizado por Scarpignato et al., 1980. Para isso camundongos Swiss machos (n = 8) foram mantidos em jejum durante 12 horas e tratados por v.o. com o veículo (tween 80 5%; 10 mL/kg), loperamida 5 mg/kg (controle positivo) e *p*-cimeno (25, 50, 100 e 200 mg/kg). Após 1 h do tratamento,

0,4 mL de marcador de cor semissólido (vermelho de fenol a 0,05% em 1,5% de carboximetilcelulose) foi administrado a um grupo controle não tratado chamado "grupo tempo zero", e, em seguida, esses animais foram eutanasiados imediatamente. Já os grupos tratados com o veículo e o *p*-cimeno receberam este marcador e vai ser eutanasiados 30 minutos após sua administração. A cavidade abdominal foi aberta para remoção do estômago, sendo necessária a ligação do piloro e esfíncteres esofágico inferior, evitando a perda do conteúdo do estômago. O conteúdo gástrico foi colhido em tubos Falcon®, solubilizado em 7 mL de água destilada e centrifugado a 3000 rpm durante 15 min. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi misturado com 1 mL de NaOH 0,025 N e agitado utilizando um vortex. A partir deste material, 150 µL foram pipetadas 10 em microplacas em duplicata e levado para leitura em espectrofotômetro (570 nm). Os resultados foram expressos como a percentagem de esvaziamento gástrico em relação ao controle ("grupo tempo zero").

$$\% \text{ Esvaziamento Gástrico} = \frac{100 - \text{Média da amostra}}{\text{Média tempo zero}} \times 100$$

3.2.1.3. Avaliação de efeitos no trânsito intestinal

Para a avaliação do efeito do *p*-cimeno sobre o trânsito intestinal foi realizada com base no modelo preconizado por Stickney e Northup (1959). Para isso foram utilizados camundongos Swiss machos (n = 7) mantidos em jejum durante 12 horas e tratados oralmente com o veículo (tween 80 5%; 10 mL/kg), loperamida 5 mg/kg (controle positivo) e *p*-cimeno (25, 50, 100 e 200 mg/kg). Após 60 minutos foi administrado 10 mL/kg (v.o.) do marcador (suspensão de carvão vegetal em goma arábica a 5%). Após 30 minutos, os animais foram eutanasiados e feita a remoção do intestino, desde duodeno até a junção ileocecal. Com uma régua, o comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado (última parte que compreende pelo menos uma pontuação contínua de 1 cm) foram medidos para calcular a percentagem de trânsito intestinal:

$$\% \text{ Tr\^ansito intestinal} = \frac{\text{Comprimento percorrido pelo carv\~ao}}{\text{Comprimento total do intestino}} \times 100$$

3.2.2 Mecanismos de a\~cao antimitilidade

3.2.2.1 Avalia\~ao da participa\~ao dos receptores adren\^ergicos, NO e dos KATP nos mecanismos anti-motilidade do *p*-cimeno no modelo de tr\^ansito intestinal

Esses protocolos foram conduzidos de acordo com modelos realizados por Santos; Rao (1999) e Capasso et al. (2001). Camundongos (n=7) foram submetidos a um jejum de 24h e pr\^e-tratados, por via intraperitoneal, com ioimbina (antagonista dos receptores pr\^e-sin\^apticos α_2 adren\^ergicos, 1 mg/kg), propranolol (antagonista n\~ao seletivo dos receptores adren\^ergicos, 1 mg/kg), L-NAME (inibidor da atividade da NO-sintase, 25 mg/kg) ou glibenclamida (bloqueador dos canais de KATP, 1 mg/kg). Ap\~os 30 minutos do bloqueio foi realizado a administra\~ao por via oral de tween 80 5% (ve\~iculo 10 mL/kg) ou *p*-cimeno na melhor dose. Trinta minutos depois, os animais receberam oralmente uma suspens\~ao de carv\~ao ativado (10%) em goma ar\^abica (5%). Ap\~os 60 minutos os animais foram eutanasiados, seus abd\~omens foram abertos e o intestino removido (piloro a jun\~cao \~leo cecal). O comprimento total do segmento intestinal e a dist\~ancia percorrida pelo carv\~ao ativado (at\^e o \~ultimo cent\~imetro cont\~inuo) foram mensurados para calcular a porcentagem de tr\^ansito intestinal.

$$\% \text{ Tr\^ansito intestinal} = \frac{\text{Comprimento percorrido pelo carv\~ao}}{\text{Comprimento total do intestino}} \times 100$$

3.2.3. Avalia\~ao do mecanismo antissecret\~orio do *p*-cimeno no modelo de acumula\~ao intraluminal de fluido (enteropooling) induzido por \~leo de r\~icino

Os efeitos sobre enteropooling intestinal foram avaliados conforme protocolos descritos por Ezeja; Anaga (2010) adaptado. Camundongos (n=7), ap\~os jejum de 24 h, foram pr\^e-tratados, por via oral, com tween 80 5% (ve\~iculo 10 mL/kg), loperamida 5 mg/kg (controle positivo) e o *p*-cimeno na melhor dose

a partir do modelo de diarreia induzida por óleo de rícino. Após 60 minutos, para indução da diarreia, os animais receberam, por via oral, 10 mL/kg de óleo de rícino. Após 1 h os camundongos foram eutanasiados, os intestinos removidos (piloro a junção íleo-cecal) e pesados com o conteúdo intestinal (intestino cheio), depois foi retirado o conteúdo intestinal e será pesado novamente (intestino vazio). A diferença entre o primeiro e o segundo peso vai ser considerada como o peso do conteúdo intestinal de cada animal.

3.2.4. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do *p*-cimeno

Nos ensaios biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana sobre cepas de bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos o *p*-cimeno foi pesado e devidamente solubilizado em 250 µL (5%) de dimetil-sulfóxido (DMSO) e adicionados 100 µL (2%) de tween 80 e completou-se o volume final com água destilada esterilizada q.s.p. 5 mL. Dessa forma, foi obtida a concentração inicial do produto de 1024 µg/mL e diluído em série até 16 µg/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2014).

3.2.4.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de Cleeland; Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008). A determinação da CIM das substâncias sobre cepas bacterianas e fúngicas foram realizadas pela técnica de microdiluição em caldo em placa para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de RPMI/BHI duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL da emulsão dos produtos preparados foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foi obtida concentrações de 1024 µg/mL até 16 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das cepas bacterianas e fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismos (CBHI + bactérias e RPMI + leveduras

ou fungos filamentosos) e meio de cultura (RPMI/CBHI), para comprovação da viabilidade das cepas e esterilidade do meio, respectivamente. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas para os ensaios com bactérias e leveduras, já os fungos filamentosos foram incubados a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias.

No caso do ensaio biológico com as bactérias, após 24 h de incubação, foi adicionado 20 μL de solução do corante resazurina a 0,01 % (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998). O ensaio foi incubado $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 h. Após a mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permanece azul, significa a ausência de crescimento microbiano. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador

A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 600 $\mu\text{g/mL}$ = forte atividade; 600-1500 $\mu\text{g/mL}$ = moderada atividade; > acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$ =fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

Em seguida foi feito o ensaio para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) Bactericida Mínima (CBM). Após leitura da CIM, alíquotas de 20 μL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM X 2, CIM X 4) foram semeadas em placas de microdiluição/96 poços, contendo o meio de cultura líquido adequado para cada grupo de micro-organismos. As placas foram incubadas a 35°C /24-48 horas/leveduras e bactérias e a TA ($28-30^\circ\text{C}$) / 7 dias. A CFM e CBM foi considerada como a menor concentração do produto que foi capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos (aproximadamente 99 a 99,5 % de atividade de morte), pela observação da ausência de crescimento no meio líquido. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's CBM's obtidas nos dois ensaios (HAFIDH et al., 2011).

3.3 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como uma percentagem da média \pm SEM (dados paramétricos) e mediana (mínimo-máximo) para dados não-paramétricos. As diferenças entre as médias/mediana serão analisadas estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) ou one-way ANOVA (dados paramétricos), seguidos de pós-testes de Dunnet ou Dunns com $p < 0,05$. Todos os dados serão analisados utilizando GraphPad Prism software versão 5.0 (GraphPad Software Inc®, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do *p*-cimeno sobre a diarreia em camundongos induzida pelo óleo de rícino

De acordo com os resultados observados, os camundongos do grupo controle negativo tratados apenas com o veículo (tween 80 5% - 10 mL/kg) apresentaram sinais intensos de diarreia, com índice de evacuação 14 (13-20) e 45% de fezes líquidas. O pré-tratamento com as doses do *p*-cimeno (100 e 200 mg/kg v.o.) não foi observado fezes líquidas e diminuiu o índice de evacuação em 2 (1-4) com 85% de inibição da diarreia ($p < 0,01$) e 0 (0-0) com 100% de inibição ($p < 0,001$), respectivamente, quando comparado com grupo controle negativo. A droga antidiarreica padrão, loperamida (5 mg/kg, v.o.), diminuiu o índice de evacuação em 4 (0-5), com 16% de fezes líquidas e produziu uma inibição de 82% da diarreia (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito da administração oral do *p*-cimeno e da loperamida na diarreia induzida por óleo de rícino

<i>Tratamento</i> (v.o.)	<i>Dose</i> (mg/kg)	<i>Índice de Evacuação</i> (IE)	<i>% Fezes</i> <i>líquidas</i>	<i>% Inibição</i> <i>Diarreica</i>
Tween 80 5%	-	14 (13-20)	45	-
Loperamida	5	4 (0-5)**	16	82
<i>p</i>-cimeno	25	10 (4-13)	20	55
<i>p</i>-cimeno	50	5 (3-7)	19	67
<i>p</i>-cimeno	100	2 (1-4)**	0	85
<i>p</i>-cimeno	200	0 (0-0)***	0	100 ###

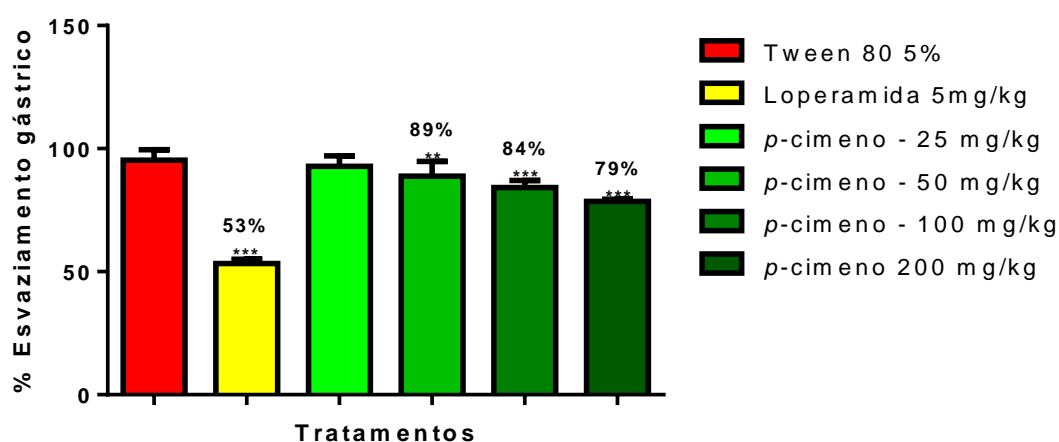
Os dados estão apresentados como mediana (mínimo-máximo). Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$ - em comparação com o grupo *p*-cimeno (100 mg/Kg) ($n = 7$).

4.2 Efeito do *p*-cimeno sobre o esvaziamento gástrico

Os resultados desse modelo mostraram que os camundongos tratados com o veículo (tween 80 5% - 10 mL/kg) apresentou 64% de esvaziamento gástrico. Os grupos tratados com a loperamida e o *p*-cimeno nas doses de 50,

100 e 200 mg/kg reduziram o esvaziamento gástrico em 53% ($p < 0,001$), 89% ($p < 0,01$), 84% ($p < 0,001$) e 79% ($p < 0,001$), respectivamente, quando comparados ao grupo de controle negativo (Tween 80 5%) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Efeito da administração oral do *p*-cimeno e da loperamida no esvaziamento gástrico de camundongos

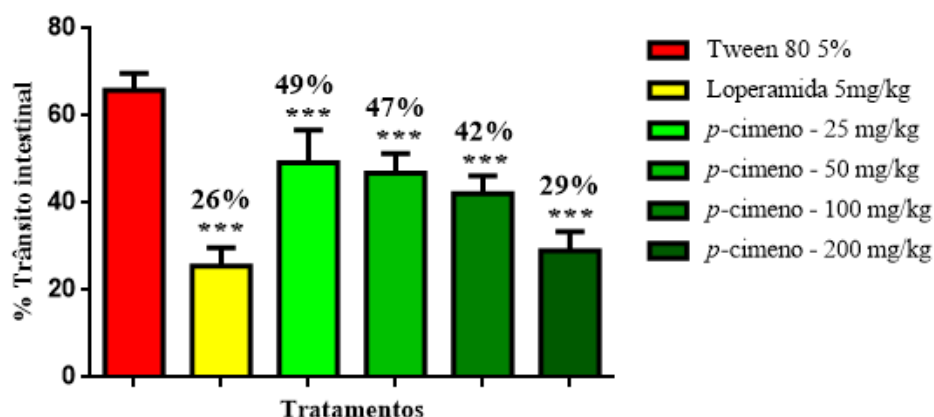


Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnet e Tukey (** $p < 0,01$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ - em comparação com o grupo de Tween 80 5%) ($n=8$)

4.3 Efeito do *p*-cimeno no trânsito intestinal

Os resultados desse protocolo mostraram que a distância percorrida pelo carvão, em termos de percentagem do comprimento total do intestino foi de 66% no grupo controle negativo. Já o tratamento com a loperamida e o *p*-cimeno em todas as doses testadas reduziram significativamente ($p < 0,001$) a percentagem de trânsito intestinal (26, 49, 47, 42 e 29%, respectivamente) quando comparados com o grupo de controle negativo (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Efeito da administração oral de *p*-cimeno e loperamida em trânsito intestinal em camundongos

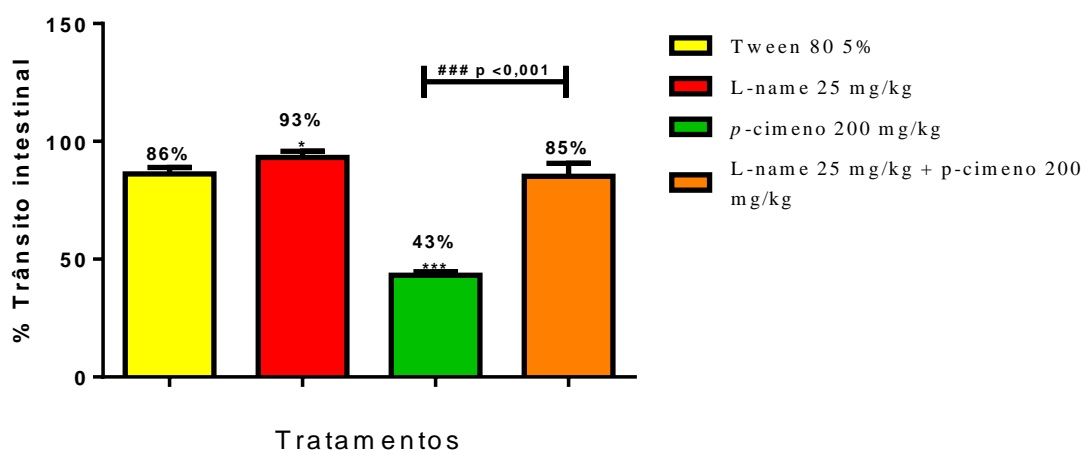


Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett e Tukey (***) $p < 0,001$ - em comparação com o grupo de TWEEN 80 5%) ($n=7$).

4.4. Avaliação da participação do NO no mecanismo anti-motilidade do *p*-cimeno no modelo de trânsito intestinal

Com base nos resultados foi possível observar que o *p*-cimeno (200 mg/kg) inibiu o trânsito intestinal do marcador carvão ativado para 43% ($p < 0,001$) em comparação ao controle negativo 86%. O pré-tratamento com L-NAME reverteu de forma significativa o efeito inibitório desse monoterpene sobre o trânsito intestinal para 85% ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo tratado apenas com L-NAME 93%. Esses dados foram expressos no gráfico 3.

Gráfico 3: Efeito da administração oral do *p*-cimeno sobre a participação do NO no mecanismo anti-motilidade do *p*-cimeno no modelo de trânsito intestinal

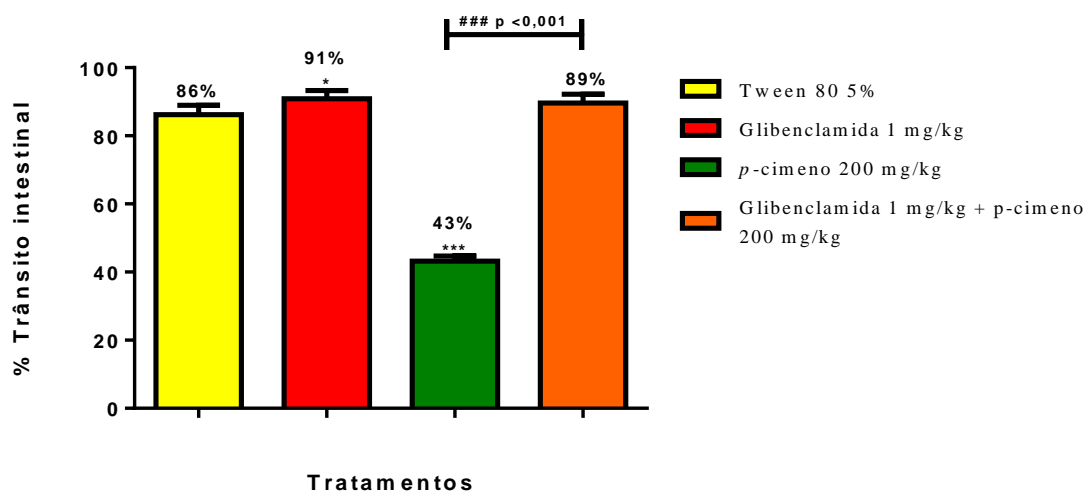


Os dados foram apresentados como média \pm d.p. (One way ANOVA, pós-teste de Dunnett ***p < 0,001 em comparação ao grupo controle negativo, tween 80 5%).

4.5. Avaliação da participação do KATP no mecanismo anti-motilidade do *p*-cimeno no modelo de trânsito intestinal

Com base nos resultados foi possível observar que o *p*-cimeno (200 mg/kg) inibiu o trânsito intestinal do marcador carvão ativado para 43% ($p < 0,001$) em comparação ao controle negativo 86%. O pré-tratamento com Glibenclamida reverteu de forma significativa o efeito inibitório desse monoterpeno sobre o trânsito intestinal para 89% ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo tratado apenas com Glibenclamida 91%. Esses dados foram expressos no gráfico 4.

Gráfico 4: Efeito da administração oral do *p*-cimeno sobre a participação do KATP no mecanismo anti-motilidade do *p*-cimeno no modelo de trânsito intestinal

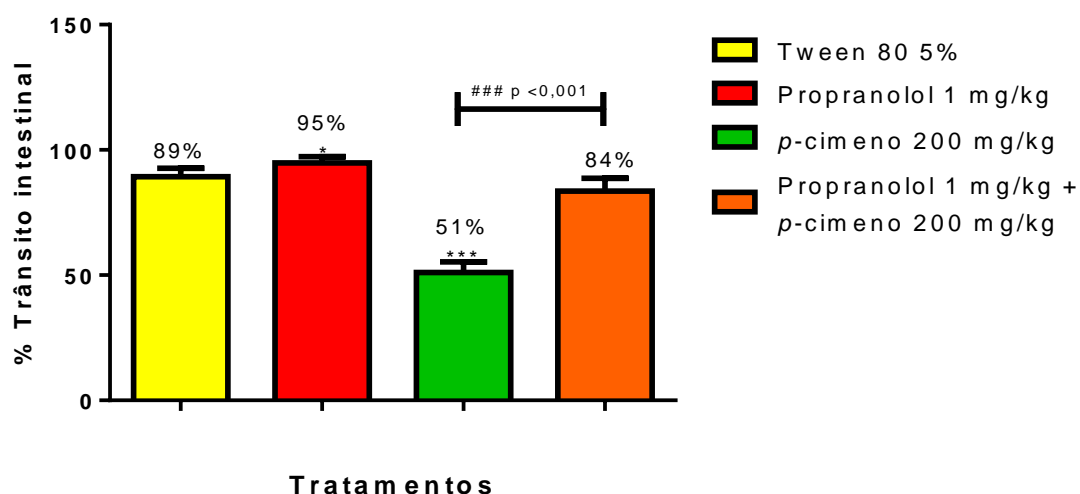


Os dados foram apresentados como média \pm d.p. (One way ANOVA, pós-teste de Dunnett ***p < 0,001 em comparação ao grupo controle negativo, tween 80 5%).

4.6. Avaliação da participação dos receptores adrenérgicos pós sinápticos no mecanismo anti-motilidade do *p*-cimeno no modelo de trânsito intestinal

Com base nos resultados foi possível observar que o *p*-cimeno (200 mg/kg) inibiu o trânsito intestinal do marcador carvão ativado para 51% (p < 0,001) em comparação ao controle negativo 89%. O pré-tratamento com propranolol reverteu de forma significativa o efeito inibitório desse monoterpene sobre o trânsito intestinal para 84% (p < 0,001), quando comparado ao grupo tratado apenas com propranolol 95%. Esses dados foram expressos no gráfico 5.

Gráfico 5: Efeito da administração oral do *p*-cimeno sobre a participação do receptores adrenérgicos pós sinápticos no modelo de trânsito intestinal

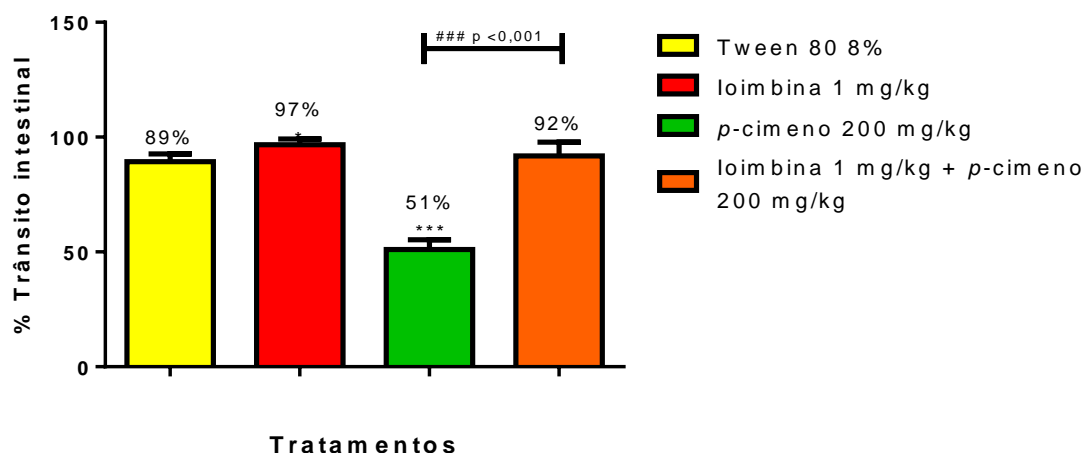


Os dados foram apresentados como média \pm d.p. (One way ANOVA, pós-teste de Dunnett ***p < 0,001 em comparação ao grupo controle negativo, tween 80 5%).

4.7. Avaliação da participação receptores pré-sinápticos α_2 adrenérgicos no mecanismo anti-motilidade do *p*-cimeno no modelo de trânsito intestinal

Com base nos resultados foi possível observar que o *p*-cimeno (200 mg/kg) inibiu o trânsito intestinal do marcador carvão ativado para 51% (p < 0,001) em comparação ao controle negativo 89%. O pré-tratamento com loimbina reverteu de forma significativa o efeito inibitório desse monoterpene sobre o trânsito intestinal para 92% (p < 0,001), quando comparado ao grupo tratado apenas com ioimbina 97%. Esses dados foram expressos no gráfico 6.

Gráfico 6: Efeito da administração oral do *p*-cimeno sobre a participação do receptores pré-sinápticos α_2 adrenérgicos no modelo de trânsito intestinal

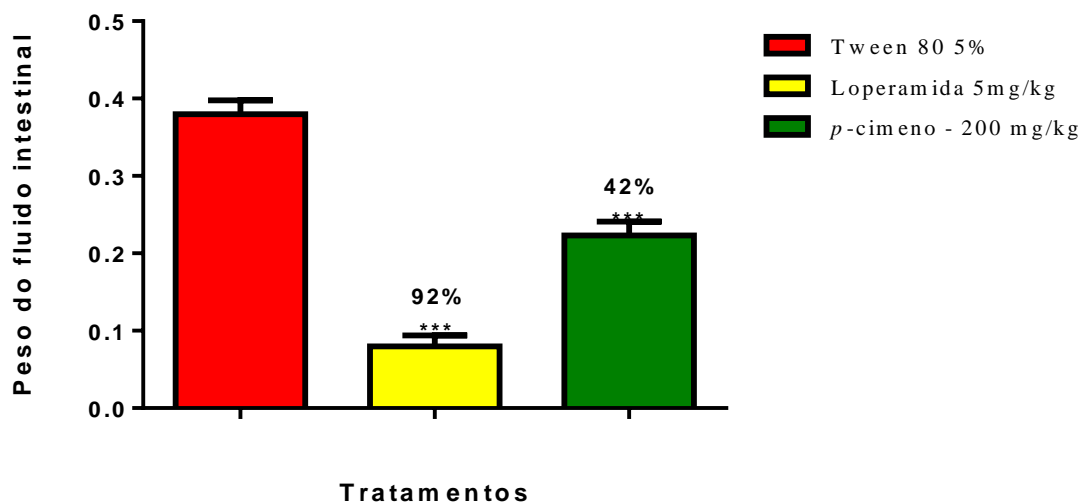


Os dados foram apresentados como média \pm d.p. (One way ANOVA, pós-teste de Dunnett ***p < 0,001 em comparação ao grupo controle negativo, tween 80 5%).

4.8. Avaliação da acumulação intraluminal de fluido (enteropooling) induzido por óleo de rícino em camundongos

O tratamento com a loperamida (5 mg/kg) e o *p*-cimeno (200 mg/kg) reduziu de forma significativa da relação de peso de fluido intestinal (g) para $0,08 \pm 0,01$, 92% (p < 0,001), $0,22 \pm 0,02$, 42% (p < 0,001), respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo $0,38 \pm 0,01$ (tween 80 5%). Esses resultados estão expressos no gráfico 7.

Gráfico 7: Efeito da administração oral do *p*-cimeno sobre enteropooling induzido por óleo de rícino em camundongos



Os dados foram apresentados como média ± d.p. (One way ANOVA, pós-teste de Dunnett ***p < 0,001 em comparação ao grupo controle negativo, tween 80 5%).

4.9 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do *p*-cimeno no modelo da concentração inibitória mínima (CIM)

Na Tabela 2, estão registrados os resultados da avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do *p*-cimeno, na concentração de 1024 a 16 µg/mL. O fitoconstituente produziu inibição sobre o crescimento de todas (100%) as espécies microbianas até a concentração de 32 µg/mL, concentração esta inferior as dos controles nistatina, cloranfenicol e fluconazol. E a Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Bactericida Mínima (CBM) do produto contra as cepas bacterianas e fungícas ficou estabelecida em 64 µg/mL.

Tabela 2. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM (µg/mL) do *p*-cimeno em cepas bacterianas e fúngicas.

Produto <i>p</i> -cimeno	<i>C. albicans</i> ATCC-76485	<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019	<i>C. neoformans</i> ATCC-6258	<i>S. aureus</i> ATCC-13150	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>E. coli</i> ATCC-18739	<i>S. enteritidis</i> ATCC-6017	<i>A. fumigatus</i> ATCC-40640	<i>P. citrinum</i> LM-278	<i>F. oxysporum</i> URM-5693	<i>C. carrionni</i> LM-283
1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cloranfenicol 100 µg/MI	-----	-----	-----	-----	-	+	-	-	-----	-----	-----	---
Nistatina 100UI/MI	-	-	-	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---
Fluconazol 50 µg/mL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	-		

(+): Crescimento do micro-organismo (-): Não houve crescimento do micro-organismo

(-----): Controle não usado nos ensaios.

4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem sido intensificada a busca por estratégias terapêuticas a partir de produtos naturais, em especial plantas medicinais, para o tratamento de distúrbios no trato gastrointestinal a exemplo de úlcera péptica, doenças inflamatórias intestinais e diarreia, considerando que muitos medicamentos existentes no mercado apresentam-se com eficácia limitada, efeitos colaterais e alto custo (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013; SHIKOVET al., 2014).

Aproximadamente 60% dos medicamentos disponíveis comercialmente são baseados em compostos bioativos extraídos de fontes naturais ou usados para síntese química completa ou parcial de novos compostos (CRAGG; NEWMAN, 2013). Isso demonstra que estruturas de produtos naturais continuam a desempenhar um papel muito importante no processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas (CRAGG; NEWMAN, 2012).

A diarreia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, especialmente nos países em desenvolvimento, e é responsável pela morte de milhões de pessoas a cada ano (BIK, RELMAN 2014).

O *p*-cimeno é um monoterpreno presente em diversas espécies vegetais que possui atividades farmacológicas no TGI. O mesmo apresentou resultados promissores frente a atividade gastroprotetora, antiúlcero-gênica e anti-inflamatória.

Nessa perspectiva, o presente trabalho foi realizado com o intuito de investigar a atividade antidiarreica do *p*-cimeno, seus efeitos antissecretores e na motilidade GI, como também a sua atividade antimicrobiana nos diferentes modelos experimentais.

O primeiro passo do presente estudo foi avaliar se o *p*-cimeno possuía efeito antidiarreico, e, para isso foi utilizado o modelo de diarreia induzido por óleo de ricino em camundongos (AWOUTERS et al., 1978). O óleo de ricino é hidrolisado na porção superior no intestino delgado em ácido ricinoléico, pelas lipases intestinais, causando irritação e inflamação da mucosa intestinal que estão associados à liberação de substâncias endógenas como prostaglandinas

e NO. Estas substâncias podem estimular a secreção de fluido, inibir a absorção de água e de eletrólitos, reduzir a absorção de Na⁺ e K⁺ e diminuir a atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase no intestino delgado e no cólon (FRANCA et al., 2008; SHENG et al., 2015; SUN et al., 2010).

A loperamida é um fármaco opióide e uma droga padrão antidiarreico, sendo esta atividade relacionada a mecanismos antimotoilidade relacionada ao antagonismo de canais de cálcio também responsável pelo seu efeito antidiarreico e antissecretório pela inibição transporte de eletrólitos e da permeabilidade paracelular reduzindo a secreção dos fluidos (BALAJI et al, 2012). A loperamida é uma das drogas antidiarréicas mais eficazes da terapêutica existente e amplamente utilizadas. No presente estudo, a loperamida comprovou efetivamente as afirmações por antagonizar a atividade diarreica induzida pelo óleo de rícino.

Considerando que o *p*-cimeno diminuiu significativamente a diarreia induzida por óleo de rícino nos três parâmetros avaliados (índice de evacuação, percentual de fezes líquidas e percentual de inibição da diarreia) nas doses de 100 e 200 mg/kg, quando comparado com o grupo controle negativo. Além disso, o *p*-cimeno apresentou melhores resultados quando comparados ao grupo tratado com a loperamida. É possível sugerir que a ação antidiarreica deste monoterpene pode estar relacionada a um efeito antimotoilidade ou antissecretório produzido pelo *p*-cimeno.

No estudo conduzido por Umar et al. (2015) foi utilizado o modelo de diarreia por óleo de rícino com os diterpenos stachysrosane 1 e 2 e os resultados apontaram uma diminuição da diarreia desses diterpenos, nas doses de 15, 30 e 45 mg/Kg, resultado semelhante aos encontrados no presente estudo, uma vez que o *p*-cimeno e os stachysrosane 1 e 2 são terpenos. Um outro estudo realizado por Jalilzadeh-Amin e colaboradores (2015) avaliou o óleo essencial de *Mentha longifolia* L. (EOML), que tem como principais componentes o pulegone e 1,8-cineol, nas doses de 20 e 80 mg/kg apresentou atividade antidiarreica, no mesmo modelo avaliado.

A motilidade gastrintestinal é regulada por diversos peptídios, hormônios e neurotransmissores, como a acetilcolina, gastrina, somatostatina, motilina,

substância P, adrenalina e noradrenalina, serotonina, dopamina e NO. Além disso, o processo de motilidade gastrointestinal também é regulado por canais iônicos como os canais de cálcio e potássio de membrana, CFTR e os K_{ATP}. Disfunções na motilidade, tais como, alterações no esvaziamento gástrico, têm sido associadas a diversas desordens gastrointestinais, incluindo dispepsia funcional, constipação, síndrome do intestino irritável e diarreia (CAMPBELL, 2014; CHENG et al., 2010; DONOWITZ, 2012; NAM et al., 2016).

O esvaziamento gástrico é um processo fisiológico complexo, que compreende a passagem e a entrega do conteúdo gástrico para o duodeno, assegurando uma absorção ideal em um tempo e fluxo adequado (MILLER et al., 2018; ROSTAS et al., 2011). A diminuição na porcentagem de esvaziamento gástrico evidenciada com o *p*-cimeno sugere um possível efeito anti-motilidade o que justifica a atividade antidiarreica deste composto. Em um estudo conduzido por Caldas et al. (2011) foi demonstrado uma diminuição da porcentagem de esvaziamento gástrico para o óleo essencial da espécie *Hyptis martiussi* (Lamiaceae) nas doses avaliadas de 100 e 200 mg/Kg. Esta espécie é rica em monoterpenos a exemplo, 1,8-cineol, terpinoleno e δ -3-Careno. Desta forma os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os resultados encontrados por Caldas et al., (2011) uma vez que os constituintes ativos responsável pela redução do esvaziamento gástrico são terpenos.

O próximo passo do estudo foi investigar o efeito do *p*-cimeno no trânsito intestinal de camundongos utilizando para isso o ensaio de trânsito intestinal, tendo o carvão ativado como marcador. Os resultados nesse modelo demonstraram uma diminuição da propulsão intestinal em todas as doses avaliadas. Esses achados ratificam os dados encontrados no experimento anterior, sugerindo que a atividade antidiarreica do *p*-cimeno também está relacionada a atividade antimotilidade mediada por este monoterpeno. Estudo descrito por Ghader et al. (2015) com o óleo essencial da *Mentha longifolia* L rico em monoterpenos, sabineno, pinenos e neril acetato diminuiu o trânsito intestinal nas doses avaliadas 60 e 80 mg/kg. Assemelha-se aos resultados obtidos no presente estudo com o *p*-cimeno.

Uma vez avaliada e constatada a atividade antimotilidade do *p*-cimeno, se fez necessária a continuidade dos estudos na perspectiva de avaliar as vias

relacionadas com esse efeito. Assim, foi avaliado uma possível participação da via nitrérgica mediado pelo óxido nítrico, participação de canais para potássio sensíveis ao ATP e a via adrenérgica avaliando assim a participação dos receptores pré e pós-sinápticos.

O óxido nítrico intestinal (NO) é um neurotransmissor liberado por neurônios entéricos inibitórios e é um potente ativador da secreção no intestino sendo considerado um regulador do transporte basal de água intestinal (GRONEBERRG et al., 2016).

O NO uma vez liberado pelos neurônios motores causam respostas estereotipadas de hiperpolarização pós-junção, consistindo em potenciais de junção inibitória nitrérgica (IJPs) que resultam no relaxamento do músculo liso, modulando assim a motilidade gastrointestinal em estados fisiológicos e fisiopatológicos. Esta molécula atua ativando a guanilato ciclase (GC), levando a produção de cGMP que fosforila proteína kinase G, e esta por sua vez ativa canais para K⁺ promovendo diminuição do influxo de cálcio, promovendo assim o relaxamento da musculatura lisa (KHROMOV et al., 2006; SANDERS et al., 2012; NAM et al., 2016).

No presente estudo, os resultados obtidos mostraram que o *p*-cimeno teve seu efeito antimotilidade revertido quando avaliado em associação com L-NAME, um inibidor da NO sintase (NOS), sugerindo uma possível participação na via do NO para o efeito antimotilidade desse fitoconstituente.

Assim como o NO, os canais de potássio, desempenham um importante papel no trato gastrointestinal que é a regulação fisiológica no tônus da musculatura lisa. Dentre estes canais, os canais para potássio sensíveis ao ATP (KATP) são expressos em grande quantidade (SANDERS; KOH; WARD, 2006; SANDERS, 2008). A ativação dos KATP promove uma hiperpolarização da membrana celular, diminuição do influxo de Ca²⁺ intracelular e inibição a excitabilidade celular, gerando assim o relaxamento do músculo liso (STANDEN, 2005; KIM et al., 2008).

Neste estudo, foi observado que na presença de um bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP, a glibenclamida, o efeito antimotilidade do

p-cimeno foi revertido, sugerindo assim que o mesmo possivelmente também participa da via dos KATP.

Efeito semelhante foi observado em um estudo realizado por Formiga e Colaboradores (2017), em que o extrato da *Maytenus erythroxylon* Reissek (EtOHE-Me), que é rico em triterpenos como o friedelan-3 β -ol (QUEIROGA, 2000; BASHIR et al., 2011) mostrou atividade antidiarreica. A dose avaliada de 500 mg/kg do EtOHE-Me, apresentou uma redução do percentual de trânsito intestinal e este efeito antimotilidade da espécie vegetal está relacionado a via nitrérgica e dos KATP. Logo, os resultados do nosso estudo corroboram aos resultados encontrados na literatura.

A ativação das inervações simpáticas do intestino resulta em inibição da atividade peristáltica e redução do tônus. Este efeito inibitório é mediado principalmente por agonistas α_2 -adrenérgicos. Assim, a ativação dos receptores α_2 adrenérgicos pré-juncionais inibe a liberação de acetilcolina de neurônios do plexo mioentérico, consequentemente reduzindo a motilidade gastrointestinal (MBAGWU; ADEYEMI, 2008).

A ioimbina, antagonista dos receptores α_2 adrenérgicos, aumenta liberação de acetilcolina dos terminais pré-sinápticos, resultando em aumento do tônus colônico (BHARUCHA et al., 2008; AKINDELE; SALAKO; OHONBAMU, 2014). No presente estudo, os resultados obtidos mostraram que o *p*-cimeno teve seu efeito antimotilidade revertido quando administrado em associação com a ioimbina. Dessa forma podemos inferir uma possível participação na via adrenérgica para o efeito antimotilidade desse constituinte ativo.

O próximo passo foi avaliar a participação dos receptores β adrenérgicos no efeito antimotilidade do *p*-cimeno. Esses receptores estão ligados às proteínas Gs, que, por sua vez, estão unidas à adenilato ciclase. A ligação do neurotransmissor aos receptores provoca aumento na concentração do segundo mensageiro celular, AMPc. Na mesma direção, os efetores do AMPc incluem PKA, que medeia alguns dos eventos intracelulares dentre eles a diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e assim relaxamento intestinal (BORTOLOTTI, CAMUSSIM-COLOMBO, 2009). O propranolol bloqueia o efeito agonista dos neurotransmissores simpáticos sobre os receptores β_1 e β_2 ,

competindo pelos lugares de união ao receptor (BORTOLOTTI, CAMUSSIM – COLOMBO, 2009).

Neste estudo, foi observado que na presença de um bloqueador não seletivo dos receptores beta adrenérgicos, o propranolol, o efeito antimotilidade do *p*-cimeno foi revertido, sugerindo assim que a participação da via adrenérgica desse monoterpeno, além de uma ativação pré-sináptica, a ativação de receptores pós-sinápticos também está possivelmente envolvida. Resultado semelhante foi observado por Formiga e Colaboradores (2017), cujo EtOHE-Me quando foi associado ao propranolol, promoveu um aumento no trânsito intestinal, ou seja, o extrato teve seu efeito antimotilidade revertido pela ação do bloqueador.

Assim o *p*-cimeno produziu uma redução significativa na atividade antidiarreica e no trânsito gastrointestinal. Dessa forma, em sido observado que substâncias que atuam a motilidade, frequência, e consistência de diarreia também podem agir sobre a secreção (HSU, 1982; MILLER et al., 2018).

Para o presente estudo foi selecionado o modelo de enteropooling induzido por óleo de rícino na perspectiva de avaliar um possível efeito antissecretório relacionado à atividade antidiarreica. Os resultados desse estudo mostraram que o *p*-cimeno reduziu significativamente o volume de conteúdo intestinal após a indução da secreção intestinal. Neste contexto, o efeito desse monoterpeno pode estar relacionado a uma redução da diarreia por aumento da reabsorção de eletrólitos e água e/ou inibição do acúmulo do fluido intestinal, inferindo assim possivelmente um mecanismo antissecretório e pró-absortivo.

Resultado semelhante foi observado por Pérez-Gutiérrez et al. (2013) no estudo com o diterpeno 19-deoxyisoicetexone (25 mg/kg), mostrando uma diminuição na relação peso de fluido intestinal. Esses dados corroboram com os nossos resultados uma vez que o *p*-cimeno assim como 19-deoxyisoicetexone, são constituintes químicos pertencentes à classe dos terpenos.

Estudos epidemiológicos tem mostrado a importância da shigelose e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) como causas de morbidade e mortalidade por diarreia em lactentes e crianças pequenas e menores de 5 anos de idade (ALI et al., 2012; KOTLOFF et al., 2013). Estimativas mostram que para

as regiões do Sul da Ásia e África, que a *E. coli* é a causa de 30% dos episódios anuais de diarreia entre crianças maiores que 5 anos e 82% de mortes por diarreia global entre crianças menores de 5 anos (LIU et al., 2012; LAMBERTI et al., 2014).

A *Escherichia coli* pode causar diarreia por diferentes mecanismos, um deles é por adesão as células hospedeiras do TGI que ocorre em três estágios: 1) aderência localizada inicial ou não intimida; 2) translocação de fatores de virulência para a célula hospedeira através de um sistema de secreção tipo 3 (T3SS), levando à disfunção do citoesqueleto; e 3) íntima fixação de células hospedeiras e formação de pedestais de actina e lesões de fixação / apagamento (GUJRALET al., 2015). Outro mecanismo relacionado a atividade diarreica é a liberação de toxinas bacterianas, que atuam na ativação do receptor de guanil cilase particulada acoplada a proteína Gs, gerando um aumento do AMPc, ativação da PKA, que por sua vez aumento da secreção de íons e eletrólitos, desencadeando assim os episódios diarreicos (GUJRALET al., 2015).

Os produtos naturais, como os óleos essenciais (OE) de plantas medicinais, e seus fitoconstituintes, possuem diversas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Além disso a atividade antimicrobiana de óleos essenciais ricos em terpenos foram avaliadas em vários microorganismos e tem mostrado eficacia contra quase todas as espécies bacterianas (BURT et al., 2003; CARSON et al., 2011; DADALIOĞLU et al., 2004).

Assim, o presente estudo tem como objetivo de avaliar a atividade antibacteriana do *p*-cimeno utilizou cepas de bactérias causadores de diarreia como: *Staphylococcus aureus* ATCC-13150, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853, *Escherichia coli* ATCC-18739 e *Salmonella enteritis* ATCC-6017.

Os resultados mostraram que este fitoconstituente, na concentração de 32 µg/mL/CIM e 64 µg/mL/CBM, produziu inibição sobre o crescimento das 4 cepas bacterianas, ou seja, o *p*-cimeno apresenta atividade antibacteriana.

Estudos anteriores já avaliaram a atividade antibacteriana do *p*-cimeno em cepas de bactérias causadoras de diarreia, a exemplo de um estudo realizado por Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2010) mostrou que o *p*-

cimeno inibiu o crescimento de cepas de *Vibrio cholerae* (ATCC 14033, VC1, and VC7).

Além disso a atividade antibacteriana dos monoterpenos α -terpineol, linalol, eucaliptol e α -pineno foram avaliadas por Zengin e Colaboradores (2014). O eucaliptol apresentou maior sensibilidade na atividade antibacteriana as cepas de *E. coli* O157: H7, *S. aureus* e *Salmonella typhimurium* e o α -pineno apresentou atividade frente *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Um estudo realido por Chalchat e colaboradores (2000) avaliou o CIM dos enantiômeros (+) (-) de α -pineno, β -pineno e limoneno em cepas de bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), no mesmo modelo avaliado do presente estudo e mostrou que esses terpenos inibiram o crescimento das cepas bacterianas testadas. Assim os nossos resultados corroboram com os resultados encontrados com os da literatura, uma vez que foram avaliados para esta atividade monoterpenos.

No TGI, as leveduras do gênero *Candida* são as mais descritas na literatura como membro da microbiota intestinal, pode provocar, por translocação, infecções sistêmicas. Evidências mostram que em indivíduos imunodeprimidos, apresentaram diarreia provocada pela infecção por *Candida albicans* (KRAUSE et al., 2001; 2005). Awoyen e colaboradores (2017) mostrou que 62,3% dos pacientes com HIV que apresentaram uma contagem de CD4 abaixo de 200 células / mm² possuem diarreia crônica por infecção por *candida spp.*

As espécies do gênero *Candida* são os fungos oportunistas que mais causam infecção no TGI após exposição a antibióticos, como também, foi observado um isolamento prevalente em fezes diarreicas de crianças após exposição a antibióticos (FORBES et al., 2001; 2002). Um estudo realizado por Vaishnavi e colaboradores (2008) mostrou que indivíduos em tratamento com antibióticos, apresentam intensa diarreia e das 111 amostras fecais, 32 foram positivas para identificação das espécies do gênero *Candida* (*C.albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*). Não se sabe ao certo o mecanismo de ação pelo qual as espécies desse gênero causam diarreia. Entretanto sabe-se que a patogenicidade desse fungo se dá pela secreção de aspartil proteinase, enzima

capaz de degradar o muco intestinal, o que contribui para a patogenicidade da levedura, facilitando sua penetração na barreira mucosa e subsequente adesão e invasão nas células epiteliais. Uma variedade de adesinas fúngicas estão envolvidas na ligação a proteínas de superfície da célula hospedeira, incluindo componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina e fibrinogênio, fatores estes que podem estar relacionados a episódios diarreicos uma vez que as funções dos enterócitos do epitélio intestinal estarão comprometidas (SILVA et al., 2014).

Assim, o presente estudo afim de avaliar a atividade antifúngica do *p*-cimeno avaliou cepas de fungos causadores de diarreia como *Candida albicans* ATCC-76485; *C. tropicalis* ATCC-13803; *C. parapsilosis* ATCC-22019, como também, afim de ampliar o conhecimento das atividades farmacológicas do *p*-cimeno frente a atividade antifúngica, foram testados cepas de *Criptococcus neoformans* ATCC-6258; *Aspergillus fumigatus* ATCC-40640; *Penicillium citrinum* LM-278, *Fusarium oxysporum* URM-5893 e *Cladosporium carionii* LM-283.

Os resultados mostraram que este fitoconstituente, na concentração de 32 µg/mL/CIM e 64 µg/mL/CFM, produziu inibição sobre o crescimento das 8 cepas fúngicas avaliadas, ou seja, o *p*-cimeno apresenta atividade antifúngica.

O *p*-cimeno já apresentou atividade antifúngica em estudos anteriores. Kordali e colaboradores (2008) observou que o OE de *Origanum acutidens*, que tem como componentes majoritários o carvacrol e o *p*-cimeno, inibiu o crescimento micelial de 17 fungos patogênicos e seus efeitos antifúngicos foram superiores aos fungicidas comerciais.

Diversos OEs, ricos em terpenos, possuem atividade antifúngica. Um estudo realizado por Souza e Colaboradores (2016) avaliou 15 óleos essenciais em cepas de *C. tropicalis* ATCC 13803. Os resultados mostraram que o Óleo essencial de *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae), que tem como constituintes majoritários os monoterpenos Geraniol e o Linalol, foi o mais efetivo na atividade antifúngica. O Eugenol apresentou atividade contra células de *C. albicans* e *C. tropicalis* em biofilmes (RUKAYADI et al., 2013). O OE de *Myrtus communis*, rico em álcool terpênicos (fenol, *p*-cimeno-8-ol, geraniol, terpineol e borneol),

demonstraram uma inibição efetiva da atividade de adesão e a formação de biofilme em três espécies isoladas de amostras clínicas: *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (RANE et al., 2013). O OE de *O. basilicum* os principais metabolitos secundários (Geraniol e Linalol), foram eficazes contra a formação de biofilme por duas cepas resistentes de *C. albicans* e *C. neoformans*. Esta atividade antifúngica é devido a redução da quantidade de esterol extraído e do tamanho da cápsula fúngica, sugerindo que elas desempenham um papel importante, em particular causando destruição da parede celular de *C. neoformans* devido a formação de irregularidades na membrana fúngica. Como também, levando a presença de vesículas e espessamento da parede celular nas cepas de *C. albicans* (PEKMEZOVIC et al., 2016). Dessa forma os nossos resultados corroboram com os resultados da literatura devido a atividade antifúngica de terpenos.

Os terpenos podem desempenhar um papel relevante também durante as infecções mistas devido à presença concomitante de bactérias e fungos. Por exemplo, infecções polimicrobianas mistas devido à presença de bactérias e fungos patogênicos, comumente encontradas em indivíduos com infecções crônicas. Os OEs cítricos, ricos em mentol, *p*-cimeno, e sabineno, são capazes de impedir o biofilme polimicrobiano formado por *Pseudomonas aeruginosa* e fungos patogênicos, em especial *A. fumigatus* (LIU et al., 2017).

Esta coletânea de resultados da literatura de terpenos que possuem atividade antimicrobiana, cassemelha-se com os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que foi testado o *p*-cimeno que é um monoterpene e que produziu inibição sobre o crescimento das 12 cepas bacterianas e fungicas avaliadas. Podendo ser considerado um produto de forte atividade antimicrobiana conforme os critérios de Holetz et al. (2002), Sartoratto et al. (2004), Houghton et al. (2007).

5. CONCLUSÃO

Os resultados da presente investigação indicam que o *p*-cimeno possui atividade antidiarreica e esta atividade está relacionada a um efeito antimotilidade e antissecretório. As vias nitrégicas, adrenérgicas e KATP possivelmente estão envolvidas com a atividade antimotilidade desse terpeno. Além disso, o *p*-cimeno possui atividade antimicrobiana e esta atividade está relacionada ao efeito antifúngico e antibacteriano desse composto. Dessa forma o *p*-cimeno apresenta-se como um produto com alto potencial farmacológico para ser utilizado na terapêutica da diarreia.

REFERÊNCIAS

- ABERA, B. Medicinal plants used in traditional medicine by Oromo people, Ghimbi District, Southwest Ethiopia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 10(1), 2014.
- AKINDELE A.J. et al., Evaluation of the antidiarrhoeal activity of the hydroethanolic leaf extract of *Pupalia lappacea* Linn. Juss. (Amaranthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, p. 984–989, 2014.
- AKINMOLADUN, A. C., Ibukun, E. O., Afor, E., Obuotor, E. M., & Farombi, E. O. Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. **Scientific Research and Essay**, 2(May), 163–166, 2007.
- AL-JIBOURY, H.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 28, p.594-601, 2012.
- ALTUNDAG, E., & Ozturk, M. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, 19, 756–777, 2011.
- ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n. 4, p. 517-524, 2006.
- ARAÚJO TSL. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.174, p. 299-307, 2015.
- ASBAHANI, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., ... Elaissari, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 483(1–2), 220–243. 2015.
- AWAAD, A. S. A. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer, **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, p. 101124, 2013.

AWOUTERS F, NIEMEGEREERS CJ, LENAERTS FM, JANSSEN PA. Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 30:41-45, 1978.

AWOYENI, A., Olaniran, O., Odetoyin, B., Hassan-Olajokun, R., Olopade, B., Afolayan, D., & Adekunle, O. Isolation and evaluation of *Candida* species and their association with CD4+T cells counts in HIV patients with diarrhoea. **African Health Sciences**, 17(2), 322–329, 2017.

BAKER DE. Loperamide: a pharmacological review. **Review Gastroenterology Disorders**, 7(Suppl 3):S11–8. 2007.

BAKKALI, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46(2), 446–475, 2008.

BALAJI G, CHALAMAIAH M, RAMESH B, REDDY AY. Antidiarrhoeal activity of ethanol and aqueous extracts of *Carum copticum* seeds in experimental rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. S:1151-1155. 2012.

BANSAL, V. K.; GOEL, R. K. Gastroprotective effect of *Acacia nilotica* young seedless pod extract: Role of polyphenolic constituents. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 523-528, 2012.

BARBUT F. Managing antibiotic associated diarrhoea. **BMJ**. 324(7350):1345-1346, 2002.

BARKUN, A., Love, J., Gould, M., Pluta, H., Steinhart, A. H., Barkun, A., ... Steinhart, A. H. Bile acid malabsorption in chronic diarrhea: pathophysiology and treatment. - **PubMed - NCBI**, 27(11), 653–660, 2013.

BARRACA J.M.B.. Protocolo diagnóstico de la diarrea crónica. **Medicine**, v. 12(4), p.197-202, 2016.

BARTOLOME, A.P. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): botanical properties, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. **Evid.-Based Complement. Alternative Medicine**. eCAM, 2013.

BASHIR S., MEMON R. Antispasmodic and Antidiarrheal Activities of *Valeriana hardwickii* Wall. Rhizome Are Putatively Mediated through Calcium Channel Blockade. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.84, p. 6, 2011.

BECK, R. G., & Beck, R. G. Nitroergic signaling via interstitial cells of Cajal and smooth muscle cells influences circular smooth muscle contractility in murine colon. **Neurogastroenterology & Motility**. 30:e13300, 2018.

BENCHAAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A.V.; FRASER, G.R.; COLOMBATTO, D.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production, **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209-228, 2008.

BERRIDGE, M. Cellular processes. **Cell Signalling Biology**, v. 2014 (1), p. 95-101, 2014.

BHARUCHA E. et al. Relationship of cytochrome P450 pharmacogenetics to the effects of yohimbine on gastrointestinal transit and catecholamines in healthy subjects. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 20(8), p. 891–899, 2008.

BIK, E. M., & Relman, D. A. Unrest at home: Diarrheal disease and microbiota disturbance. **Genome Biology**, 15(6), 8–10, 2014.

BONJARDIM, L. R.; CUNHA, E. S.; GUIMARAES, A. G.; SANTANA, M .F.; OLIVEIRA, M. G. B.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A.; ANTONIOLLI, A. R.; CAVALCANTI, S. C.; SANTOS, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive properties of pCymene in Mice, **Zeitschrift Fur Naturforschung**, v. 67, p.15-21, 2012.

BORAH, U., Dash, B., Dash, S., & Kalita, L. Preliminary Phytochemical Screening and in Vitro Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Whole Aerial Part of the Herb *Leucas Plukenetii* Spreng (Family-Lamiaceae). **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, 9(3), 87, 2017.

BORTOLOTTI, L. a., & Consolim-Colombo, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. **Rev Bras Hipertens**, 16(4), 215–220, 2009.

BRASIL. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. **Cad. At. Basica**, n.31, p.27-84, 2012.

BRAZ-FILHO R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**. 33(1): 229-239. 2010.

BRUNTON LL, LAZO JS, PARKER KL. Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2011.

CALDAS A G.F.R. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v.137, p. 886– 892, 2011

CAMILLERI M. Novel Diet, Drugs and Gastric Interventions for Gastroparesis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.15, p.1542-3565, 2016.

CAMPBELL, I. Gut motility and its control. **Anaesthesia & Intensive Care. Medicine**, v. 16 (1), p. 40-42, 2014.

CHALCHAT, J. C., Chiron, F., Garry, R. P., Lacoste, J., & Sautou, V. Photochemical hydroperoxidation of terpenes. Antimicrobial activity of α -pinene, β -pinene and limonene hydroperoxides. **Journal of Essential Oil Research**, 12(1), 125–134, 2000.

CHEN L, Bioactivity- Guided Fractionation of an Antidiarrheal Chinese Herb *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim Reveals (-)-Epicatechin-3-Gallate and (-)-Epigallocatechin-3- Gallate as Inhibitors of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator., **PlosOne** 2015.

CHEN, T., Sun, M., Ramchandran, R., & Raj, J. U. Mirna Cargo In Microvesicles Released From Hypoxic Pulmonary Arterial Endothelial Cells Induces Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation And Pulmonary Hypertension, **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**; 10, 416135, 2017.

CHENG LK, GRADY GO, DU P, EGBUJI JU, WINDSOR JA, PULLAN AJ. Gastrointestinal system. **Reviews: Systems Biology and Medicine**. v. 2, p. 65-79, 2010.

CHOI J. Laxative effects of fermented rice extract in rats with loperamide-induced constipation. **Experimental and Therapeutic. Medicine** v.8, p.1847-1854, 2014.

CHU S, SCHUBERT ML. Gastric secretion. **Current Opin Gastroenterology Journal**. 28:58793, 2013.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE a . Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE b . Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A2. Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE c . Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07-A10. Pennsylvania, United States of America: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUI, L., Morris, A., & Ghedin, E. The human mycobiome in health and disease. **Genome Medicine**, 5(7), 1–12, 2013.

DA SILVA, R. E. ASPECTOS ÉTICOS, LEGAIS E TENDÊNCIAS NO DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS CLÍNICOS NO BRASIL. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, 2014.

DA SILVA, V. C.; RODRIGUES, C. M. Natural products: an extraordinary source of value-added compounds from diverse biomasses in Brazil. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, p. 14, 2014.

DANTAS RO. Diarréia e constipação intestinal. **Semiology symptoms**. 37:262-266, 2004.

DAVE, M., Higgins, P. D., Middha, S., & Rioux, K. P. The human gut microbiome: Current knowledge, challenges, and future directions. **Translational Research**, 160(4), 246–257, 2012.

DE SOUSA, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233–2252, 2011.

DIMIDI, E., Christodoulides, S., Scott, S. M., & Whelan, K. Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on Gut Motility and Constipation. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, 8(3), 484–494, 2017.

DINESEN L, HARBORD M. Acute diarrhea. **Medicine**. 42:104-108, 2013.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 305-311, 2005.

DUPONT, H. L. Persistent diarrhea a clinical review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, 315(24), 2712–2723, 2016.

DUTRA, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R. S., & Calixto, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 112, 4–29, 2016.

EDLAM T. Evaluation of the anti-diarrheal activity of the aqueous stem extract of *Lantana camara* Linn (Verbenaceae) in mice. **BMC**. 17:190. 2017.

EFEYAN, A. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. **Nature**, 517(7534), 302-10. 2015.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplatemethod to determine the Minimal Inhibitory Concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FERNANDEZ-BANARES F, ACCARINO A, BALDOA A, DOMENECH E, ESTEVE M, GARCIAPLANELLA, GUARDIOLA A, VAQUERO E. Diarrea crónica:

definición, clasificación y diagnóstico. **Gastroenterología y Hepatología**. 956:123, 2015.

FERNANDO C. Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal gum acacia induced hyperperistalsis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 128:49e51. 2010.

FORMIGA, R., De Fátima Formiga Melo Diniz, M., Marinho, A. F., Tavares, J. F., Batista, L. M., & Quirino, Z. G. M. Maytenus erythroxylon Reissek (Celastraceae) ethanol extract presents antidiarrheal activity via antimotility and antisecretory mechanisms. **World Journal of Gastroenterology**, 23(24), 4381–4389, 2017.

FREIRE, I.C.M.; PÉREZ, A.L.A.L. ; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; PADILHA, W.W.N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre Streptococcus mutans e Staphylococcus aureus. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16 n.2, 2014.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 9(5), 286–294, 2012.

FURNESS, J. B., & Stebbing, M. J. The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. **Neurogastroenterology and Motility**, 30(2), 1–6, 2018.

GALLIGAN JJ. Molecular physiology of enteric opioid receptors. **American Journal Gastroenterology Supple**. 2(1):17–21. 2014.

GAMES, E., Guerreiro, M., Santana, F. R., Pinheiro, N. M., de Oliveira, E. A., Lopes, F. D. T. Q. S., ... Prado, C. M. Structurally Related Monoterpenes p-Cymene, Carvacrol and Thymol Isolated from Essential Oil from Leaves of Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae) Protect Mice against Elastase-Induced Emphysema. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 21(10), 1–17, 2016.

GAUGLER, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., ... Buxbaum, J. D. Most genetic risk for autism resides with common variation. **Nature Genetics**, 46(8), 881–885, 2014.

GERALD TK. Disease control priorities in developing countries. 2nd ed. **New York: Oxford University Press**. 2006.

GERSHON, M. D., & Tack, J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. **Gastroenterology**, 132(1), 397–414, 2007.

GONG, Y. B., Zheng, J. L., Jin, B., Zhuo, D. X., Huang, Z. Q., Qi, H., ... Mao, Z. Bin. Particular candida albicans strains in the digestive tract of dyspeptic patients, identified by multilocus sequence typing. **PLoS ONE**, 7(4), 2012.

GOULET, O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. **Nutrition Reviews**, 73, 32–40, 2015.

GREEN, E.; SAMIE, A.; OBI, C.L.; BESSONG, P.O.; NDIP, R.N. Inhibitory properties of selected Souh African medicinal plants against Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Ethnopharmacology**. 130:151157, 2010

GREENLAND, K., Chipungu, J., Chilengi, R., & Curtis, V. Theory-based formative research on oral rehydration salts and zinc use in Lusaka, Zambia. **BMC Public Health**, 16(1), 2016.

GUIMARÃES, A. G., QUINTANS, J. S. S., QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with analgesic activity-a systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1–15, 2013

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAFIDH, R. R., ABDULAMIR, A. S., VERN, L. S., BAKAR, F. A., ABAS, F., JAHANSHIRI, F. AND SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 98-106, 2011.

HEMPEL S. Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea. **CLINICAL CORNER**. Vol 307, No. 18. 1959-1969. 2017.

HIMANSHU BS. Antidiarrhoeal investigation of *Apium leptophyllum* (Pers.) by modulation of Na⁺K⁺ATPase, nitrous oxide and intestinal transit in rats. **Biomedicine Journal**. 39 376 e381. 2016.

HOLETZ, F.B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

HSU, W. H. Department of Veterinary Physiology and Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, U.S.A., 83, 55–60, 1982.

JALILZADEH-AMIN, G., & Maham, M. Antidiarrheal activity and acute oral toxicity of *Mentha longifolia* L . essential oil, **Avicenna J Phytomed** 5(2), 128–137, 2015.

JALILZADEH-AMIN, G., & Mahama, M. Evaluation of Pulegone on Transit Time and Castor-Oil Induced Diarrhea in Rat, **Pharmaceutical sciences**, 19(3), 77-82, 2013.

JOGLEKAR, M. M., Panaskar, S. N., & Arvindekar, A. U. Inhibition of advanced glycation end product formation by cymene - A common food constituent. **Journal of Functional Foods**, 6(1), 107–115, 2014.

JONES, G., Steketee, R. W., Black, R. E., Bhutta, Z. A., & Morris, S. S. How many child deaths can we prevent this year? **Lancet**, 362(9377), 65–71, 2003.

JOURET-MOURIN, A., Geboes, K., Pathologique, A., Hospitalier, C., Tournai, R. De, & Sumi, R. I. Colites infectieuses Infectious colitis, **Acta Endoscopica**, 32, 167–183, 2002.

JUNYA N. L-Ornithine and L-lysine stimulate gastrointestinal motility via transient receptor potential vanilloid 1. **Molecular Nutrition & Food Research**, 34, 1-33. 2017.

KARCZEWSKA, E., Wojtas, I., Sito, E., Trojanowska, D., Budak, A., Zwolinska-Wcislo, M., & Wilk, A. Assessment of co-existence of *Helicobacter pylori* and *Candida* fungi in diseases of the upper gastrointestinal tract. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 60(SUPPL.6), 33–39, 2009.

KATZUNG BG, TREVOR A. Basic and Clinical Pharmacology. Katzung & Trevor's Pharmacology Examination and Board Review. 12th Edition. Lange, 2014.

KEDIA, A., Prakash, B., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology**, 168–169, 1–7, 2014.

KELLOW, J. E., Azpiroz, F., Delvaux, M., Gebhart, G. F., Mertz, H. R., Quigley, E. M. M., & Smout, A. J. P. M. Applied Principles of Neurogastroenterology: Physiology/Motility Sensation. **Gastroenterology**, 130(5), 1412–1420, 2006.

KIM K et al. *Sasa quelpaertensis* leaf extract suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by inhibiting the proinflammatory mediators and mitogenactivated protein kinase phosphorylation. **Nutrition Research**. v. 34, p.894 – 905, 2014.

KO, E. A., Jin, B. J., Namkung, W., Ma, T., Thiagarajah, J. R., & Verkman, A. S. Chloride channel inhibition by a red wine extract and a synthetic small molecule prevents rotaviral secretory diarrhoea in neonatal mice. **Gut**, 63(7), 1120–1129, 2014.

KOEPPEN B.M, STANTON B.A. Berne & Levy: Fisiologia, 6^a ed., Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

KORDALI, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M., & Mete, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, 99(18), 8788–8795, 2008.

KOTLOFF, K.L. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet** **382**, 209–222. 2013.

KRAUSE, R., & Reisinger, E. C. Candida and antibiotic-associated diarrhoea. **Clinical Microbiology and Infection**, 11(1), 1–2, 2005.

KRAUSE, R., Schwab, E., Bachhiesl, D., Daxböck, F., Wenisch, C., Krejs, G. J., & Reisinger, E. C. Role of Candida in antibiotic-associated diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, 184(8), 1065–1069, 2001.

KRISHNAN, S., Alden, N., & Lee, K. Pathways and functions of gut microbiota metabolism impacting host physiology. **Current Opinion in Biotechnology**, 36, 137–145, 2015.

KUMAR S. V., SARAVANAN D., KUMAR B., JAYAKUMAR A. An update on prodrugs from natural products. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** v.7, p.54-59, 2014.

Laboratório Globo Ltda. Cloridrato de loperamida [Bula], 1–12, 2014.

LAMBERTI, L. M., Bourgeois, A. L., Fischer Walker, C. L., Black, R. E., & Sack, D. Estimating Diarrheal Illness and Deaths Attributable to Shigellae and Enterotoxigenic Escherichia coli among Older Children, Adolescents, and Adults in South Asia and Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(2), 1–8, 2014.

LAWRENCE R. SCHILLER. Antidiarrheal Drug Therapy. **Current Gastroenterology Report**. 19: 18: 18–32. 2017.

LEITE, L. P. Avaliação da atividade gastroprotetora do p-cimeno (p-isopropiltolueno) em modelos animais. Dissertação (Mestrado em Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), João Pessoa – PB, 2014.

LIU L. Child health epidemiology referencegroup of WHO and UNICEF. Global, regional andnational causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **Lancet**, 379:2151–61. 2012.

LIU, M., Williams, K. J., & Werth, V. P. Microvesicles in Autoimmune Diseases. **Advances in Clinical Chemistry**, 1st ed., Vol. 77, 2016.

MACFARLANE, G. T., & Macfarlane, S. Fermentation in the human large intestine: Its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 45(SUPPL. 3), 120–127, 2011.

MANABE N. CAMILLERI M.,RAO A.,WONG B.S.,BURTON D.,BUSCIGLIO I.,ZINSMEISTER A. R., HARUMA K. Effect of daiken chuto (TU-100)on gastrointestinal and colonic transit in humans. **American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 298. p.970–975, 2010.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.

MARIETTA, E., Horwath, I., & Taneja, V. Microbiome, Immunomodulation, and the Neuronal System. **Neurotherapeutics**, 15(1), 23–30, 2018.

MBAGWUA H.O.C., ADEYEMI O.O. Anti-diarrhoeal activity of the aqueous extract of *Mezoneuron benthamianum* Baill (Caesalpiniaceae). **Journal of Ethnopharmacology** v.116, p.16–20, 2008.

MEKONNEN S. Evaluation of the antidiarrheal activity of the leaf extracts of *Myrtus communis* Linn (Myrtaceae) in mice model. **BMC Medicine**. 17:10. 2017.

MEKONNEN, B., Asrie, A. B., & Wubneh, Z. B. Antidiarrheal Activity of 80% Methanolic Leaf Extract of *Justicia schimperiana*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.

MILLER, K. E., Bajzer, Ž., Hein, S. S., Phillips, J. E., Syed, S., Wright, A. M., ... Linden, D. R. High temporal resolution gastric emptying breath tests in mice. **Neurogastroenterology and Motility**, (February), 1–12, 2018.

NAM Y, LEE J.M, WANG Y. The effect of *Flos Lonicerae Japonicae* extract on gastrointestinal motility function. **Journal of Ethnopharmacology**, v.179, 280–290, 2016.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.

NAZZARO, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, 10(4), 1–20, 2017.

NEWMAN DJ, CRAGG CM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Natural Products**. 70(3): 461-477. 2007

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NIETO, Y. B. Úlcera péptica. **Medicine**, v. 11 (3), p. 137-141, 2012.

NITZAN O, ELIAS M, PERETS A, SALIBA W. Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. **World Journal Gastroenterology**. 21:1078-87, 2016

NJUME C, AFOLAYAN AJ, NDIP RN. An overview of antimicrobial resistance and the future of medicinal plants in the treatment of Helicobacter pylori infections. **African Journal Pharmacy and Pharmacology** 9:3911-3933, 2012.

OLASUPO. Antidiarrheal activity of hexane extract of Citrus limon peel in an experimental animal model. **Journal of Integrative Medicine**. Vol. 15, No. 2. 158-168. 2017.

OLIVEIRA A. F. Estimativa da prevalência e da mortalidade por complicações da úlcera péptica, Brasil, 2008: uma proposta metodológica. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 24(1), p. 145-154, 2015.

OTT, S. J., Kühbacher, T., Musfeldt, M., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Rehman, A., ... Schreiber, S. Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 43(7), 831–841, 2008.

PASSOS MDCF, M.-F. J. Intestinal microbiota in digestive diseases, **Arq Gastroenterol** 2017.

PATHAK K. Herbal medicine-a rational approach in health care system. **Integrative Journal Ayurvedic Herbal Medicine**. 1:86–9. 2. 2013.

PAYNE, D. C., Vinjé, J., Szilagyi, P. G., Edwards, K. M., Staat, M. A., Weinberg, G. A., Parashar, U. D. Norovirus and Medically Attended Gastroenteritis in U.S. Children. **New England Journal of Medicine**, 368(12), 1121–1130, 2013.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 1–7, 2014.

PERÉZ-GUTIÉRREZ R. Antidiarrheal Activity of 19-Deoxyicetexone Isolated from *Salvia ballotiflora* Benth in Mice and Rats. **Molecules**. 18 p. 8895-8905, 2013.

RAHMAN, M. K., Chowdhury, M. A. U., Islam, M. T., Chowdhury, M. A., Uddin, M. E., & Sumi, C. D. Evaluation of Antidiarrheal Activity of Methanolic Extract of *Maranta arundinacea* Linn. Leaves. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2015, 1–6, 2015.

RATTANACHAIKUNSOPON, P., & Phumkhachorn, P. Synergistic Antimicrobial Effect of Nisin and rho-Cymene on *Salmonella enterica* Serovar Typhi in Vitro and on Ready-to-Eat Food. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 74(3), 520–524, 2010.

RECORD, M., Subra, C., Silvente-poirot, S., & Poirot, M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. **Biochemical Pharmacology**, 81(10), 1171–1182, 2011.

REGNARD, C., Twycross, R., Mihalyo, M., & Wilcock, A. Loperamide. **Journal of Pain and Symptom Management**, 42(2), 319–323, 2015.

ROBLES-ALONSO, V., & Guarner, F. Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. **Nutricion Hospitalaria**, 28(3), 553–557, 2013.

ROSTAS, J.W.; TAM, M.D.; MAI, M.D.; WILLIAM, O.R.M.D. Gastric Motility Physiology and Surgical Intervention. **Surgery Clinical North America Journal**, v.91, p.83–999, 2011.

RUFINO, R., Gracie, R., Sena, A., Freitas, C. M. de, & Barcellos, C. Surtos de diarreia na região Nordeste do Brasil em 2013, segundo a mídia e sistemas de informação de saúde – Vigilância de situações climáticas de risco e emergências em saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, 21(3), 777–788, 2016.

RUI H., FANG T . Effects of Wei Chang An pill on enzyme activity and levels of vasoactive peptide and substance P in the small intestine of rats with compound diarrhea. **Journal of Tradicional Chinese Medicine**. v. 32(1), p.52-57. 2012.

SAHOO HB. Antidiarrhoeal investigation from aqueous extract of *Cuminum cyminum* Linn. Seed in Albino rats. **Phcognosy Research**.6:204e9. 2014

SALES. R. I., , P. D. E., & Sales, I. R. P. De. *Cissampelos sympodialis* EICHL. (MENISPERMACEAE): AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMOTILIDADE E ANTIDIARREICA IN VIVO. 2014.

SANDERS, K. M., Koh, S. D., Ro, S., & Ward, S. M. Regulation of gastrointestinal motility-insights from smooth muscle biology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 9(11), 633–645, 2012.

SANTANA, M. F., Quintans-Júnior, L. J., Cavalcanti, S. C. H., Oliveira, M. G. B., Guimarães, A. G., Cunha, E. S., ... Bonjardim, L. R. P-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 21(6), 1138–1143, 2011.

SANTELMANN, H., & Howard, J. M. L. Yeast metabolic products, yeast antigens and yeasts as possible triggers for irritable bowel syndrome. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 17(1), 21–26, 2005.

SANTOS F.A. Quinine-induced inhibition of gastrointestinal transit in mice: possible involvement of endogenous opioids. **European Journal of Pharmacology** v. 364, p.193-197, 1999.

SANTOS, M. P. O.; JÚNIOR, A. M. B., TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCARPIGNATO, S.; CAPOVILLA, T.; BERTACCINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of conscious rat. **Arch Int Pharmacodyn et Therapie**, v. 246, p. 286-294, 1980.

SCHILLER LR Review article: anti-diarrhoeal pharmacology and therapeutics. **Aliment Pharmacological Therapy**. 9(2):87–106. 1995.

SCHILLER LR. Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease. 10th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; p. 221–41. 2015.

SCHILLER, L. R. Definitions, pathophysiology, and evaluation of chronic diarrhoea. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, 26(5), 551–562, 2012.

SEBAI H, JABRI M.A, SOULI A. et al. Antidiarrheal and antioxidant activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology** v. 152, p. 327–332, 2014.

SELVARAJ, M., Pandurangan, A., Seshadri, K. S., Sinha, P. K., Krishnasamy, V., & Lal, K. B. Comparison of mesoporous Al-MCM-41 molecular sieves in the production of p-cymene for isopropylation of toluene. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, 186(1–2), 173–186, 2002.

SHARKEY A, MAWE G. Neurohormonal signalling in the gastrointestinal tract. **New frontiers** 592:29232925. 2014

SHARMA HL, SHARMA HK. Principles of Pharmacology. Paras Medical Publisher, Hyderabad. 412– 414, 2007. SHENG Z., YANG Z., BIN Z.. Antidiarrheal effect of *Alpinia oxyphylla* Miq. (Zingiberaceae) in experimental mice and its possible mechanism of action. **Journal of ethnopharmacology** v.460, p. 182190, 2015.

SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; CARVALHO, E. S.; RAMOS, M. F. S. Evaluation of antiinflammatory- related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 57–69, 1999.

SILVA, F. C., Rodrigues, V. G., Duarte, L. P., Lula, I. S., Sinisterra, R. D., Vieira-Filho, S. A., ... Silva, G. D. F. Antidiarrheal activity of extracts from *Maytenus Gonoclada* and inhibition of Dengue Virus by lupeol. **Anais Da Academia Brasileira de Ciencias**, 89(3), 1555–1564, 2017.

SISAY, M., Engidawork, E., & Shibeshi, W. Evaluation of the antidiarrheal activity of the leaf extracts of *Myrtus communis* Linn (Myrtaceae) in mice model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 17(1), 103, 2017.

SOMMER, F., & Bäckhed, F. Know your neighbor: Microbiota and host epithelial cells interact locally to control intestinal function and physiology. **BioEssays**, 38(5), 455–464, 2016.

SOUZA Siqueira Quintans, J., Menezes, P. P., Santos, M. R. V., Bonjardim, L. R., Almeida, J. R. G. S., Gelain, D. P., ... Quintans, L. J. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. **Phytomedicine**, 20(5), 436–440, 2013

SOUZA, C. M. C., Junior, S. A. P., Moraes, T. D. S., Damasceno, J. L., Mendes, S. A., Dias, H. J., ... Pires, R. H. Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. **Medical Mycology**, 54(5), 515–523, 2016.

STEINER, A. Modifiers of gastrointestinal motility of cattle. Vet.Clin. **North America: Food Animal Practice**.v.19, p.647–660, 2003.

STEVENSON, C., & Blaauw, R. Probiotics, with special emphasis on their role in the management of irritable bowel syndrome. **South African Journal of Clinical Nutrition**, 24(2), 63–73, 2011.

STICKNEY, J. C.; NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. **Experimental Biology Medicine**, v. 101, p. 582, 1959.

STRINGER, A. M., Gibson, R. J., Logan, R. M., Bowen, J. M., Yeoh, A. S. J., Hamilton, J., & Keefe, D. M. K. Gastrointestinal Microflora and Mucins May Play a Critical Role in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Gastrointestinal Mucositis. **Experimental Biology and Medicine**, 234(4), 430–441, 2009.

SZAJEWSKA H. Probiotics in prevention of antibiotic-associated diarrhea. **Journal of Pediatric**. 142(1):85. 2003

TADESSE, T. T., Hailu, E. E., Gurmu, E. E., & Mechesso, F. F. Experimental assessment of antidiarrheal and antisecretory activity of 80% methanolic leaf extract of *Zehneria scabra* in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14(1), 1–8, 2014.

TATE, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., & Parashar, U. D. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, 12(2), 136–141, 2012.

TEKLEHAYMANOT, T., & Giday, M. Quantitative ethnobotany of medicinal plants used by Kara and Kwegu semi-pastoralist people in lower Omo River Valley, Debub Omo Zone, Southern Nations, Nationalities and Peoples Regional State, Ethiopia. **Journal of Ethnopharmacology**, 130(1), 76–84, 2010.

THIAGARAJAH, J. R., & Verkman, A. S. CFTR inhibitors for treating diarrheal disease. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 92(3), 287–290, 2012.

THIAGARAJAH, J. R., Broadbent, T., Hsieh, E., & Verkman, A. S. Prevention of Toxin-Induced Intestinal Ion and Fluid Secretion by a Small-Molecule CFTR Inhibitor. **Gastroenterology**, 126(2), 511–519, 2004.

UMAR F., SADIA N., ABDAL M. Isolation and characterization of two new diterpenoids from *Stachys parviflora*: Antidiarrheal potential in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v.79, p. 153– 61, 2015.

UNICEF/WHO. Why children are still dying and what can be done. Final Report-Diarrhoea. Geneva, Switzerland: United Nations Children's Fund/World Health Organization; 2009.

VAISHNAVI, C., Kaur, S., & Prakash, S. Speciation of fecal *Candida* isolates in antibiotic-associated diarrhea in non-HIV patients. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 61(1), 1–4, 2008.

VELÁZQUEZ, C., Calzada, F., Esquivel, B., Barbosa, E., & Calzada, S. Antisecretory activity from the flowers of *Chiranthodendron pentadactylon* and its flavonoids on intestinal fluid accumulation induced by *Vibrio cholerae* toxin in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 126(3), 455–458, 2008.

WALKER, C. L. F., Fontaine, O., Young, M. W., & Black, R. E. Zinc and low osmolarity oral rehydration salts for diarrhoea: A renewed call to action. Bulletin of the World Health Organization, 87(10), 780–786, 2009.

WALKER, C. L., & Black, R. E. Zinc for the treatment of diarrhoea: Effect on diarrhoea morbidity, mortality and incidence of future episodes. **International Journal of Epidemiology**, 39(SUPPL. 1), 63–69, 2010.

WALKER, C. L., Rudan, I., Liu, L., Nair, H., Theodoratou, E., Bhutta, Z. A., ... Black, R. E. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **The Lancet**, 381(9875), 1405–1416, 2013.

WANG, Z. F., Li, Q., Liu, S. B., Mi, W. L., Hu, S., Zhao, J., ... Wu, G. C. Aspirin-triggered Lipoxin A4 attenuates mechanical allodynia in association with inhibiting spinal JAK2/STAT3 signaling in neuropathic pain in rats. **Neuroscience**, 273(May), 65–78, 2014.

WEBB C.. Smooth muscle contraction and relaxation. **APS c. report**. v.21, p.201-208, 2017.

WENDEL G.H., MARIA A.O.M., PELZER E. Antidiarrheal activity of dehydroleucodine isolated from *Artemisia douglasiana*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.85, p.1-8, 2008.

WHO. Diarrheal disease [Internet]. 2013. [cited 2015 January 28]. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>

WHO. Global Health Observatory 2013 - Ending Preventable Child Deaths from Pneumonia and Diarrhoea by 2025. Disponível em: <http://www.who.int/gho/child_health/en/index.html>. Acesso em 05 de fevereiro de 2014.

WHYTE LA, JENKINS HR. Pathophysiology of diarrhea. **Paediatrics and child health** 22:443-448, 2012

WIKOFF, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 106(10), 3698–703, 2009.

WILLIAMS, B. B., Van Benschoten, A. H., Cimermancic, P., Donia, M. S., Zimmermann, M., Taketani, M. Fischbach, M. A. Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine. **Cell Host and Microbe**, 16(4), 495–503, 2014.

XU Q, Shen Z, Wang Y. Anti-diarrhoeal and anti-microbial activity of Flospopuli (male inflorescence of *Populus tomentosa* Carrière aqueous extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. 148:640-646. 2013

YAKUBU MT. Antidiarrhoeal activity of *Musa paradisiaca* sap in Wistar rats. Evidence Based Complement. **Alternative Medicine**. 2015:683726. 2015

YANO, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., ... Hsiao, E. Y. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. **Cell**, 161(2), 264–276, 2015.

ZARGHAMI, M., & Rezapour, M. Loperamide Dependency: A Case Report. **Addiction & Health**, 9(1), 59–63, 2017.

ZHANG A, SUN H, WANG X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. **Euro Journal of Medical Chemistry**. 63:570-577, 2013